FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

4

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACIDE GLYCYRRHIZIQUE

CHIMIE ET PHARMACOLOGIE

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant
la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)
Le 26 Juin 1961

par

VOVAN LUU

Pharmacien
Ex-préparateur de cours de Chimie Médicale
Certifié d'Études Superieures de Chimie biologique et de Physiologie générale

MM. C. DUMAZERT — Président
Y. DERRIEN
F. PELLISSIER — Assesseurs
J. MERCIER

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACIDE GLYCYRRHIZIQUE

CHIMIE ET PHARMACOLOGIE

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant
la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)
Le 26 Juin 1961

par

VOVAN LUU

Pharmacien
Ex-préparateur de cours de Chimie Médicale
Certifié d'Études Supérieures de Chimie biologique et de Physiologie générale

MM. C. DUMAZERT — Président
Y. DERRIEN
F. PELLISSIER — Assesseurs
J. MERCIER

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen : G. MORIN — Assesseur : J. DELPHAUT
Secrétaire Principal : P. MOUCHET
Secrétaire Principal Honoraire : J. COMTE
Bibliothécaire : Mlle PERRIN.

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND, CHAUVIN, JOYEUX, MATTEI, MOIROUD, MONGES, RIMATTEI, ROCHE.

PROFESSEURS

Anatomie	GRISOLI
Anatomie appliquée et Chirurgie expérimentale	HENRY
Anatomie pathologique	GASTAUT
Bactériologie et Pathologie générale	BRAHIC
Biochimie médicale	LISSITZKY
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie clinique et expérimentale	JOUVE
Chimie	DUMAZERT
Chimie analytique	ARNOUX
Chimie Médicale	DERRIEN
Chimie Minérale	MOURGUE
Clinique chirurgicale	CARCASSONNE
Clinique chirurgicale	LAMY
Clinique chirurgicale	DE VERNEJOUL
Clinique chirurgicale infantile et orthopédique	SALMON
Clinique de chirurgie thoracique	DOR
Clinique d'endocrinologie	VAGUE
Clinique Exotique	BLANC
Clinique des maladies du système nerveux	CREMIEUX
Clinique médicale	POINSO
Clinique médicale	AUDIER
Clinique médicale thérapeutique	OLMER
Clinique des maladies infectieuses	RAYBAUD
Clinique des maladies des voies digestives et de la nutrition	RECORDIER
Clinique médicale infantile	GIRAUD
Clinique neuro-chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologique	CHOSSON
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	APPAIX
Clinique de Stomatologie	MARONNEAUD
Clinique d'Urologie	N.
Histologie	PICARD
Hygiène et Médecine Sociale	SAUTET
Matière Médicale	BALANSARD
Médecine expérimentale	DONNET
Médecine Légale et Médecine du travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie chirurgicale	LENA
Pathologie interne	MONGES H.
Pharmacologie	MERCIER
Pharmacie chimique et toxicologie	VIGNOLI
Pharmacie Galénique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physiopathologie des voies respiratoires	LAVAL
Physique médicale	DUBOULOZ
Thérapeutique	PIERI

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. ROUX, GREBUS, MERCIER J.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. BERNARD P.	MM. CRISTAU	MM. GAMBARELLI	MM. PAYAN
BOURRET	DEPIEDS	GEVAUDAN	STAHL
CORRIOL	DESANTI	PASTOR	TAMALET

AGREGES EN EXERCICE

MM. BERARD	MM. COMITI	MM. LEGRE	MM. SERMENT
BERNARD R.	DALMAS	MOUREN	SIMONIN
BONNAL	DEVIN	ORSINI	TEMIME
CHARPIN	FARNARIER	REBOUD	TRIFAUD
CHAUVIN	GERARD	SARLES	

AGREGES LIBRES

MM. BERTHIER	MM. GRANJON	MM. OLLIVIER	MM. PAOLI
FIGARELLA	IMBERT	OURGAUD	

CHARGES DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFERENCE

Physiologie ..... M. ZWIRN

CHARGES DES FONCTIONS D'AGREGES

Clinique des maladies du système nerveux	MM. BOUDOURESQUE
Clinique de Stomatologie	LACHARD
Médecine Légale	GRAS

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS.

A MA FEMME

A MES FILLES.

A MON PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur C. DUMAZERT

Qui m'a reçu avec tant de bienveillance dans son laboratoire et m'a fait le grand honneur de présider mon jury de thèse.

Qu'il veuille trouver ici, avec mon profond attachement, l'expression de ma reconnaissance pour les précieux conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer pour l'élaboration de ce travail.

A MON JURY DE THESE

Monsieur le Professeur Y. DERRIEN.

Qui le premier m'a accueilli dans son service et m'a permis de faire mes premiers pas dans les travaux de laboratoire.

Qu'il me soit permis de lui exprimer toute ma respectueuse gratitude pour l'honneur qu'il me fait de juger cette thèse.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547028_0037

Monsieur le Professeur F. PELLISSIER

Qui m'a fait l'honneur de siéger à mon jury.

Je lui exprime ma vive reconnaissance.

Monsieur le Professeur J. MERCIER

Qui s'est intéressé à mon travail et m'a dirigé avec un dévouement quotidien dans les expériences pharmacologiques.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de mes vifs remerciements.

A Monsieur Jean GREGOIRE,

Maître de Recherches au C.N.R.S.

à qui je dois ma formation scientifique.

J'ai pu apprécier, pendant les années passées à ses côtés, sa grande gentillesse et son immense savoir.

Avec tout mon attachement et ma respectueuse affection.

A Claude GHIGLIONE, Professeur Agrégé

Avec mes remerciements et ma sincère amitié.

A MES MAITRES DE LA FACULTE

A mes camarades des Laboratoires de Chimie et de Pharmacologie

en particulier à Madame DESSAIGNE

à Madame GAVEND

au Docteur GARRIGUES.

A Messieurs KREITMANN

des Etablissements REGLISSE ZAN

dont le soutien constant m'a permis de mener à bien ce travail.

Je leur exprime mes sincères remerciements.

INTRODUCTION

L'évolution rapide de la science moderne depuis une vingtaine d'années a pour conséquence, dans le domaine de la médecine, la tendance à utiliser des produits synthétiques.

La phytothérapie, qui constituait l'essentiel de l'arsenal thérapeutique de nos ancêtres, semblait marquer le pas, non parce que les plantes ont perdu de leur pouvoir curatif, mais parce que ce pouvoir n'a pas toujours trouvé les arguments scientifiques nécessaires pour convaincre l'esprit devenu de plus en plus exigeant.

C'est ainsi que, parmi les notions concernant les vertus médicinales d'une foule d'épices, d'herbes et d'extraits végétaux, quelques unes seulement ont survécu. Mais certaines plantes dont l'utilisation est courante depuis des temps immémoriaux et qui connurent une période d'oubli, sont en train de reprendre une place de choix dans la thérapeutique, cela grâce à la découverte de leurs principes actifs et de leurs propriétés physiologiques.

La réglisse en est un exemple frappant. On peut dire, sans risque d'exagérer, que cette plante est une des plus anciennement connues et des plus répandues.

En Extrême-Orient, région essentiellement bouddhiste, le "Kan-Tzao" (réglisse chinoise) était considéré comme une plante magique dont l'emploi conservait un caractère sacré. Dans le premier herbier chinois "Shen nung pen ts'ao king", la plante est classée parmi les cent vingt médicaments indispensables de la médecine. Dans le Susruta, oeuvre extraite de la littérature sanscrite du Dieu Brahma et composée aux environs de l'an 900 par Susruta, la réglisse est citée comme une panacée, un cosmétique et un composant de l'élixir de vie.

Chez les Grecs et les Romains, les propriétés médicinales de la réglisse ont été décrites avec plus de précisions. Le fameux philosophe et botaniste grec, Théophraste (300 ans av. JC) dans son ouvrage : "De Historia Plantarum Lib. XI. Cap. XIII" l'appelle "la racine douce", et rapporte que, mélangée au miel, elle guérit les ulcères ; elle est en outre active contre l'asthme, les toux sèches, les douleurs thoraciques et, mâchée, elle préserve de la soif. L'auteur cite l'exemple des Scythes qui étaient capables de rester 11 à 12 jours sans boire en gardant dans la bouche une mixture composée de réglisse et de lait de jument. Dioscoride, physicien grec, dans son ouvrage, le premier en pharmacognosie, écrit en 78 : "De Materia Medica",

énumère les mêmes propriétés, mais compare l'aspect de la plante à celui de la gentiane. Associée à du raisin sec, elle combat les douleurs de la vessie et des reins. En outre, on en fait un onguent pour les blessures. Pline, dans "Historia Naturalis, Lib. XXII. Cap. XI" préconise, entre autres, l'emploi de la réglisse dans les maux d'estomac.

En Europe Occidentale, par contre, l'utilisation de la réglisse est de date plus récente. Au Moyen-Age, la drogue s'appela liquirita, licorice, rigolice. Au XIIIème siècle, la culture de la plante prit un essor considérable dans la région méditerranéenne, s'étendant parfois dans le Sud de l'Allemagne et même en Angleterre. On connaît le consommateur illustre du suc de réglisse, Napoléon Ier, dont les dents sont devenues noires à force de sucer la drogue, remède contre les maux de l'estomac, qui lui avait été conseillé par un guérisseur.

Par la suite on ne trouva à cette plante que des applications secondaires : correcteur de goût, expectorant, excipient de pilules. Si l'industrie de la réglisse connaît une grande activité, les principaux consommateurs sont la confiserie, l'industrie du tabac et la fabrication des boissons dites hygiéniques dont le type est le "coco".

Cependant depuis quelque dizaine d'années, après que REVERS (48) eut introduit d'une manière systématique le suc de réglisse dans le traitement des ulcères gastriques, les chercheurs ont apporté un plus vif intérêt à la détermination des constituants de la réglisse ainsi que des propriétés pharmacologiques de ces derniers.

Le constituant principal de la plante, la glycyrrhizine a déjà, il y a près de cent ans, fait l'objet des travaux des chimistes. Cependant, les progrès n'ont été que très lents. Les résultats analytiques donnés par différents auteurs comportent parfois de grands écarts, de sorte qu'une vue d'ensemble de ces données laisse le lecteur dans la confusion.

Il est vraisemblable que les substances décrites n'ont pas un degré de pureté constant. Ceci expliquerait que le fait que les propriétés physiologiques attribuées à la glycyrrhizine jusqu'ici comportent des contradictions notables.

Mettant à profit les énormes progrès techniques réalisés ces dernières années dans le domaine de la physicochimie, nous nous proposons de reprendre l'étude de l'acide glycyrrhizique et de ses sels afin, soit de confirmer, soit d'infirmer les données relevées dans la littérature. Notre attention se porte plus particulièrement sur la partie osidique et sur l'isomérie de l'aglucone dans la partie chimique, tandis que dans la partie pharmacologique l'action de l'acide glycyrrhizique sur le métabolisme de l'eau et des électrolytes constitue le point principal de nos recherches.

Après un aperçu des données générales sur la réglisse et une brève revue bibliographique, nous décrirons nos travaux personnels en suivant ce plan de travail :

Première Partie : Etude physico chimique de l'acide glycyrrhizique.

I - Evaluation de la teneur en acide glycyrrhizique

II - Extraction et purification de l'acide glycyrrhizique

III - Hydrolyse de l'acide glycyrrhizique et étude des produits issus de l'hydrolyse :

A - Partie osidique : caractérisation par chromatographie

B - Aglucone :

- préparation et purification
- étude des isomères.

Deuxième Partie : Etude pharmacologique de l'acide glycyrrhizique et de ses sels.

I - Toxicité - Action hémolytique.

II - Action sur les électrolytes urinaires et sanguins.

III - Action sur le système cardio-vasculaire et la respiration.

IV - Action sur le système nerveux central.

Examen d'ensemble des résultats et conclusions.

DONNÉES GÉNÉRALES SUR LA RÉGLISSE

A - RAPPELS BOTANIQUES

Sous le nom de Réglisse, la Pharmacopée française (édition 1949) décrit les rhizômes de Glycyrrhiza Glabra L. et Glycyrrhiza glabra, variété glandulifera (Légumineuses-Papilionacées).

La plante est un arbrisseau qui peut atteindre 1,50 m. de haut ; elle pousse dans les régions subtropicales. C'est une plante vivace, à tige florifère dressée, à tige souterraine remarquable par ses rejets épais et allongés. La tige souterraine ou rhizôme, improprement racine, est longue, traçante et d'un diamètre normal de 5 à 15 mm selon l'âge. On trouve parfois des échantillons géants de 100 mm de diamètre environ. Elle est grossièrement cylindrique, lisse quand elle est fraîche, ridée quand elle est sèche, très fibreuse, d'une odeur terreuse très particulière, d'une saveur douce et agréable.

1) Culture et récolte

La réglisse pousse en général à l'état sauvage. On a essayé de la cultiver dans quelques régions en plantant au printemps les éclats de souche portant 2 ou 3 bourgeons à raison de 3 à 4 au mètre carré.

Quand la plante a au moins 3 ou 4 ans, la récolte se fait en arrachant avec soin les rhizômes noueux qui atteignent jusqu'à 50 mètres de long.

Les principaux pays où poussent la réglisse se trouvent dans la zone méridionale d'Eurasie qui comprend l'Espagne, l'Italie (Calabre et Sicile), le Sud de la France et surtout la Grèce, la Syrie, l'Iran, l'Irak, la Russie (Volga et Mer Noire). En Extrême-Orient, le principal pays producteur est la Chine (Mandchourie).

2) Variétés botaniques

On suppose en général que la réglisse appartient à l'espèce Glycyrrhiza Glabra L., néanmoins plusieurs variétés ont été décrites. L'étude systématique de ce genre est loin d'être complète à l'heure actuelle. Les travaux de BOISSIER et ceux de REGEL et HERDER permettent de classer les variétés selon le tableau I. Ce tableau donne un aperçu des origines et des caractères distinctifs de divers bois de réglisse.

Tableau I

Classement et subdivisions du genre Glycyrrhiza.

Dénomination	Variété	Provenance		Caractères botaniques			
		Sauvage	Cultivée	Tige	Feuille	Fruit	Fleur
Glycyrrhiza Glabra	Typica REG et HER	Europe du Sud - Asie Mineure	Italie du Sud (Sicile)	presque dénudée	dénudée	dénudé 4 graines le plus souvent	bleue allant jusqu'au violet pâle
Liquiritia Officinalis Moench			Espagne France Angleterre				
	Violacea BOISSIER	Vallée de l'Euphrate-Mésopotamie Syrie					violette
	Glandulifera REG et HER	Galicie-Russie Centr. et Méridion. Syrie-Perse Chine occ. Mésopotamie	Delta de la Volga Batum Allemagne (schneingent)	Glanduleuse Chevelue		2 à 6 graines	violet pâle
	Pallida BOISSIER	Mésopotamie				Calice seul glanduleux et chevelu	rougeâtre blanche
Glycyrrhiza Uralensis Fisch		Oural jusqu'à Mandchourie					
Glycyrrhiza Pallidiflora Marim		Région de l'Amour					

3) Drogues officinales

Dans toutes les Pharmacopées ayant adopté la Réglisse, seules sont utilisées les racines et rhizômes appartenant au genre glyccyrhiza.

Les racines ou rhizômes employés sont soit décortiqués soit non décortiqués.

Actuellement, les racines décortiquées sont de provenance italienne.

B - PREPARATIONS A PARTIR DE LA REGLISSE

1) Préparations officinales

Les préparations pharmaceutiques à base de racine de réglisse indiquées dans les traités médicaux de divers pays sont nombreuses.

a) Succus Liquiritae - Suc de Réglisse

La plus ancienne de ces préparations est probablement le suc de réglisse. L'examen de diverses descriptions données par la Pharmacopée de différents pays permet de classer le suc de réglisse en deux catégories :

- suc de réglisse brut : Extractum glycyrrhizae crudum,
- suc de réglisse purifié : Extractum liquiritae (depuratus).

Nous voulons d'ores et déjà citer les diverses préparations pharmaceutiques ainsi que leurs particularités, mentionnées dans les Pharmacopées française et étrangère.

Pharmacopée française

La Pharmacopée française décrit deux sortes d'extrait de réglisse :

- Extrait de réglisse = Extractum glycyrrhizae. Cet extrait s'obtient en faisant macérer la racine coupée et contusée (1 kg) dans de l'eau (5 litres) additionnée d'ammoniaque (20 g.) pendant 12 heures. On passe en exprimant le résidu qu'on fera macérer de nouveau 12 heures dans 3 litres d'eau froide, additionnée de 12 grammes d'ammoniaque. On réunit les deux liqueurs, on laisse déposer, on décante et on porte à l'ébullition. On filtre à chaud pour séparer le coagulum et on évapore au bain-marie à consistance d'extrait mou, à une température inférieure à 50° et sous pression réduite.

On obtient ainsi un produit brun, de saveur sucrée donnant dans l'eau une solution un peu trouble s'éclaircissant par addition d'ammoniaque.

On l'utilise dans la préparation des masses pilulaires comme excipient.

- Extrait brut de réglisse = Extractum glycyrrhizae crudum.- Sous cette dénomination, la Pharmacopée française décrit le produit commercial qui est l'extrait aqueux desséché de la racine de réglisse auquel se trouvent mélangés des sels terreux provenant de l'eau commune ayant servi à sa préparation ainsi que les produits de l'altération de l'extrait par la chaleur. On y rencontre des produits ajoutés, tels que le sucre, l'amidon, etc.

Il se présente soit en poudre, soit en masses, soit en bâtons cylindriques aplatis à l'une des extrémités. Il est noir et cassant, sa cassure est brillante. Sa saveur est sucrée parfois un peu âcre. Il est incomplètement soluble dans l'eau ; ses solutions filtrées moussent par agitation et précipitent par les acides forts.

Il doit contenir au minimum 10 % de glycyrrhizine ammoniacale. Il entre dans la préparation de la pâte officinale de réglisse et de la pâte officinale de réglise au goudron et au baume de Tolu.

Pharmacopées étrangères

Nous empruntons à WIEST (77) le tableau suivant qui résume les sucs de réglisse mentionnés dans les pharmacopées étrangères ainsi que leur mode de préparation (Tableau II). Nous remarquerons que certains pays adoptent le suc brut et le suc purifié, ce dernier reçoit le nom de succus liquiritae depuratus ou extractum liquiritae. On peut fabriquer ce suc par purification du suc commercial ou bien en traitant la racine de réglisse par des procédés spéciaux moins violents : eau chloroformée ou ammoniacale.

b) Succus liquiritae solutus

Selon les ouvrages médicaux actuels, cette préparation est obtenue principalement à partir du bois de réglisse. Les extraits tirés par percolation à l'eau chloroformée sont évaporés jusqu'à une certaine teneur en eau (environ 45 %) et cet extrait est ajouté à l'alcool.

c) Extractum liquiritae fluidum = Extrait fluide

Cette préparation figure dans les Pharmacopées belge, britannique, helvétique et américaine. Les procédés de fabrication consistent généralement à faire une percolation soit avec de l'alcool à 30 % (Ph. belge), soit avec de l'eau chloroformée (Brit. Ph.), soit avec de l'eau ammoniacale (Ph. helv. et U.S.P. XIII). A la fin de l'extraction on ajoute dans la plupart des cas l'éthanol à l'extrait desséché.

d) Sirupus liquiritae = sirupus glycyrrhizae = sirop de bois de réglisse

On obtient cette préparation par macération du bois de réglisse à l'eau ammoniacale, après concentration de l'extrait on ajoute de l'alcool, puis du sirop simple.

Elle figure dans les pharmacopées helvétique, américaine, hongroise et suédoise.

e) Elixir glycyrrhizae = Elixir adjuvans

Cet élixir figurait encore dans U.S.P. XI. Il comportait un mélange d'extrait fluide de bois de réglisse et un élixir aromatique. A l'heure actuelle, on ne le trouve plus dans aucune pharmacopée.

f) Elixir e succo liquiritae = Elixir pectorale

Cet élixir s'obtient en faisant fondre le suc dans l'eau de fenouil et on ajoute de l'eau ammoniacale ; après défécation assez prolongée, on obtient une solution à laquelle on ajoute une solution alcoolique d'huile d'anis. Après une nouvelle défécation, on filtre. La Pharmacopée helvétique indique la composition suivante :

Extractum liquiritae fluidum.....	40
Aqua foeniculii.....	40
Oleum anisi (stellati).....	0,1
Ammonium hydricum solutum.....	4
Spiritus.....	16

Tableau II

Sucs de réglisse mentionnés dans les pharmacopées

Pharmacopée	Suc brut	Suc purifié		
		Dénomination	Matière première	Procédés
Austriaca VIII	Extractum liquiritae venale	Extractum liquiritae	Radix liquiritae	Macération à l'eau (12h.) puis extraction à l'eau bouillante 1 heure
Brit. Pharm. 1932		Extractum glycyrrhizae	Radix liquiritae	Percolation à l'eau chloroformée
Ph. Belgica IV	Extractum glycyrrhizae crudum			
Ph. Danica VIII	Ext. glycyrrhizae crudum	Extractum glycyrrhizae	Ext. glycyrrhizae crudum	Macération répétée à l'eau ammoniacale
D.A.B. 6	Succus liquiritae	Succus liquiritae depuratus	Succus liquiritae	Macération à l'eau
Codex Gall 6	Extractum glyc. crudum	Extractum glycyrrhizae	Radix liquiritae	Macération à 2 reprises à l'eau ammoniacale
Ph. Helvetica V	Succus liqui.			
Ph. Hungaria IV	Extractum liquiritae venale aquosum siccum	Extractum liquiritae depuratum aquosum subsprissum	Extractum liquiritae venale aquosum sicc.	Percolation à l'eau
F. Port 1935		Extraction glycyrrhizae	Radix liquiritae	Macération à 2 reprises à l'eau chloroformée
U.S.P. XIII		Extractum glycyrrhizae	Radix liquir. pulvis.	Percolation à l'eau ammoniacale
Svenska F 1925	Extractum glycyr. crudum. Extractum glycyrh. siccum	Extractum glycyrrhizae	Extractum glycyrrh. siccum	Macération à l'eau

g) Autres préparations

Le suc de réglisse, le bois de réglisse en poudre entrent encore dans certaines préparations pharmaceutiques telles que : tablettes, poudres, pilules, mélanges de tisanes.

Nous trouvons dans la pharmacopée française :

- Pastilles :
  - pastilles d'opium ou pastilles de réglisse opiacées.
  - pastilles de réglisse.

Sous le nom de trochisques de réglisse, plusieurs pharmacopées étrangères indiquent des préparations qui ne diffèrent de celle-ci que par des aromates, de la manne ou de l'opium.

- Bâtons dits bâtons de réglisse blanc et bâtons de réglisse citrins
- Pâtes :
  - pâte officinale de réglisse = pasta glycyrrhizae officinalis. 100 g de cette pâte contiennent 2 cg d'extrait d'opium ; elle entre dans le régime du tableau B.
  - pâte de réglisse noire : on la nomme plus ordinairement suc de réglisse gommé ou, lorsqu'on y ajoute quelques gouttes de teinture d'anis ou d'essence d'anis, on l'appelle suc de réglisse anisé.
  - pâte officinale de réglisse au goudron et au baume de tolu = pâte de réglisse composée = pasta glycyrrhizae officinalis composita. Cette pâte est aussi inscrite au tableau B. Elle contient pour 100 g. de pâte, 2 cg d'extrait d'opium.
  - pâte dite suc de réglisse de Blois.
- Poudres :
  - poudres pectorales balsamiques.
  - poudres pectorales fondantes.
  - poudre de réglisse composée.

2) Industrie de la réglisse

La fabrication du suc de réglisse remonte à des temps très anciens mais quelques uns des procédés appliqués à l'heure actuelle sont encore rudimentaires.

L'industrie de la réglisse est localisée surtout dans le Sud de l'Europe. En Italie on traite la réglisse en Sicile et en Calabre.

En France, où la racine est surtout un produit d'importation (de Grèce, d'Iran, d'Irak, de Syrie et de Turquie), les plus grandes réglisseries se trouvent localisées dans le Sud-Est (Gard et Bouches du Rhône).

Les racines, broyées sont extraites grossièrement à l'eau, le plus souvent à l'ébullition dans des bacs en fer ou en cuivre. Un procédé amélioré utilise des batteries d'extracteurs, parfois sous pression. Les extraits aqueux sont purifiés par passage à travers des filtres ou simplement par décantation, puis on réunit tous les filtrats pour les concentrer. Cette opération se fait soit dans des chaudrons, soit dans des évaporateurs, soit dans des concentreurs sous vide. L'extrait est concentré jusqu'à ce que l'humidité soit environ 15 %. La masse partiellement refroidie est ensuite mise dans des

moules de taille convenable pour donner soit des blocs (le plus souvent), soit des pains, soit encore des bâtons, portant le nom ou la marque des fabricants.

Le suc devient dur, brillant et de couleur brun noir. Les bâtons de réglisse sont parfois enveloppés dans des feuilles de laurier ce qui donne une saveur caractéristique à ce type de réglisse (réglisse laurier).

Aussi simple que puisse paraître la méthode de préparation, les rendements quantitatif et qualitatif dépendent de nombreux facteurs qui conditionnent les caractéristiques et quelquefois les secrets de fabrication des industriels.

C - CONSTITUANTS DE LA REGLISSE

Parmi les nombreux constituants de la réglisse, le plus important est et reste la glycyrrhizine. En fait, jusqu'en 1934, cette substance seule attirait l'attention des chimistes car les éléments banaux que l'on trouve dans toutes les plantes paraissaient n'offrir aucun intérêt.

Depuis cette date, la Chimie de la réglisse a fait d'énormes progrès : d'autres glucosides intéressant la thérapeutique ont été isolés, et à l'heure actuelle on dispose d'un tableau d'ensemble assez complet des constituants de la drogue.

L'étude de la glycyrrhizine, faisant l'objet de notre travail, sera traitée par ailleurs. Nous n'étudierons ici et d'une manière sommaire que les autres constituants. Ceci nous permet d'avoir une vue générale et par suite, de faire le point des divers résultats intéressants connus jusqu'ici.

1) Glucosides autres que la glycyrrhizine

En réalité le terme glucoside ne peut s'appliquer qu'à un certain nombre de composés qui, par hydrolyse, libèrent un aglucone et du glucose. D'autres, bien qu'ils soient appelés ainsi, donnent par hydrolyse, non pas du glucose, mais un complexe osidique.

a) Saponine neutre

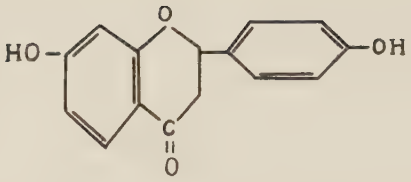
KOBERT (1915) (34) indique avoir isolé une saponine neutre insoluble dans l'éther donnant par hydrolyse une sapogénine hémolytique. Cette saponine n'a pas de goût sucré et apparaîtrait dans le traitement de la racine décortiquée après extraction de la glycyrrhizine.

b) Lapachol

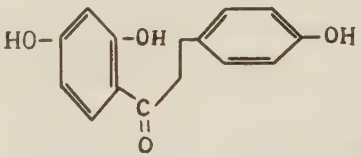
HOUSEMAN et SWIFT (1929) ont isolé de la racine chinoise un composé de poids moléculaire élevé $C_{20}H_{21}O_9$, qu'ils dénommèrent : lapachol.

c) Liquirétine et isoliquirétine

En 1934, deux auteurs japonais SHINODA et UEEDA (62) isolaient à partir d'un extrait méthanolique de la racine, un dérivé appartenant au groupe des flavonoides : la liquirétine. Cette substance se présente sous forme de cristaux incolores dont le point de fusion est 212°. Par hydrolyse, elle libère une molécule de glucose et la liquirétigénine fondant à 207°. Ces auteurs l'ont identifiée comme une dihydroxy-4'-7-flavonone dont la formule développée est la suivante :



En 1954, deux auteurs hindous, PURI et SESHADRI (46) parvinrent à isoler, en dehors de la liquirétine, apportant ainsi confirmation à la découverte des chercheurs japonais, une substance isomère, dénommée par eux, l'isoliquirétine. Celle-ci fond à 204° et possède une structure chlaconique. C'est la trihydroxy-2-4-4'-chalcone :



Dans sa thèse (Doct. Univ. Paris. Pharm. 1958) Madame POINTET-GUILLOT, devait confirmer l'existence de ces deux corps. L'auteur a, en particulier, étudié les méthodes d'extraction, les comportements physico-chimiques, chromatographiques et les propriétés physiologiques de ces deux glucosides. Par contre, on ignore encore leur pourcentage dans la racine de réglisse.

d) Substances oestrogènes

COSTELLO et LYNN, en 1950 (11) ont trouvé que la réglisse renfermait une substance d'activité oestrogénique appréciable. Ces auteurs utilisaient les méthodes de fractionnement des hormones décrites pour la séparation de ces composés à partir de l'urine. Ils parvinrent à isoler une fraction active dont le spectre d'absorption en milieu alcoolique laisse supposer qu'il s'agirait de l'oestradiol.

Cette étude de l'activité oestrogénique devait être reprise par Madame POINTET-GUILLOT qui formula la conclusion suivante : "Par chromatographie sur papier, deux spots ont été obtenus avec la fraction physiologiquement active, l'un de Rf 0,92 très identique à celui de la folliculine et l'autre de Rf 0,78 assez proche de celui de l'oestradiol" (loc. cit. (47).

e) Xanthoglabrol

Plus récemment, les Laboratoires BIOREX (Brev.) signalent l'existence d'un glucoside insoluble dans l'éther, isolé des eaux mères de la cristallisation acétique du glycyrrhizate monopotassique brut et auquel ils ont donné le nom de xanthoglabrol. Cette substance présente un spectre d'absorption dans l'U.V. en solution méthanolique, ayant des bandes à 245 mμ, 310 mμ, 370 mμ. Utilisé en solution alcaline, elle conduit à la formation des colorants azoïques rougeâtres après copulation avec des composés diazoïques. Sa formule chimique, par contre, n'a pas été signalée.

2) Hydrates de carbonne

a) Mannitol

Il a été extrait de la racine par TSCHIRCH et RELANDER (65). Ces auteurs pensent que cette substance serait formée par réduction du mannose ou de l'acide mannuronique, initialement présent dans la plante.

b) Oses

Le glucose a été identifié par TSCHIRSH. Sa teneur ne varie que très peu dans les racines d'Eurasie : 1,34 % à 1,42 % (GIAMMONIA). Elle atteint le double dans la racine chinoise (travaux personnels).

c) Disaccharides

HOUSEMAN a signalé la présence notable de sucre de canne. GIAMMONIA (20) donne aussi 3,2 % comme teneur en saccharose dans les racines de Grèce et d'Italie, alors que nous avons trouvé 5,2 % dans la racine de Chine.

d) Polysaccharides

- Amidons : la quantité varie entre 22 et 25 %
- Gommes, mucilages : MADSEN indique une teneur en gommes de 1,5 à 1,4 %. Cette matière gommeuse n'a pas toujours été identifiée.

c) Pectine

Quelques auteurs japonais signalent la présence dans la racine de réglisse de 2 à 3 % de pectine.

3) Autres produits

a) Lipides - 1 % environ (SESTINI)

b) Huiles essentielles, tanin, méthylsalicylate, signalés par HOUSEMAN (1905).

c) Asparagine

Cette substance a été isolée pour la première fois par CAVENTON qui l'appela "agedoil". En 1882, HENRI et PLISSON l'ont identifiée à l'asparagine trouvée dans l'asperge par VAUQUELIN et ROBIQUET (1809) : 3 % environ.

4) La glycyrrhizine = Acide glycyrrhizique

L'acide glycyrrhizique se trouve dans la plante à l'état de sels de potassium et de calcium.

Ce constituant principal de la réglisse a depuis toujours attiré l'attention des chimistes et nombreux sont les travaux qu'on lui a consacrés.

Un des premiers rapports sur une substance ressemblant à un sucre existant dans la réglisse est celui de ROBIQUET (1809) qui l'appelle "nature sucrée". VOGEL (1843) analyse une substance jaune et lui donne une formule brute : $C_{16}H_{26}O_6$. GORUP-BESANEZ (1861) obtient un résultat en analysant la substance par ébullition avec un acide dilué. Il trouve de la glycyrrhétine et un sucre réducteur fermentescible. ROUSSIN (1875) considère la glycyrrhizine comme un acide qui existe dans la plante à l'état de ses sels alcalins.

Le problème revient alors à identifier à la fois le sucre et l'aglucone. Les progrès sur la détermination de la nature de ces produits n'ont été que très lents car les résultats donnés par chacun des auteurs présentent des

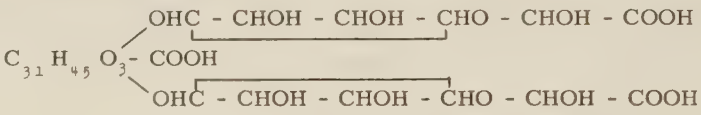
écarts vraiment très élevés, non seulement dans les détails, mais aussi dans la formule brute.

TSCHIRCH et RELANDER mettent en évidence la présence de groupements hydroxyles dans l'acide glycyrrhétinique. Reprenant les travaux antérieurs, TSCHIRCH avec CEDEBERG en 1907, et avec GAUCHMANN en 1908 (66,67) isole l'acide glycyrrhizique à l'état pur et montre que :

- l'acide glycyrrhizique n'est pas azoté
- sa formule brute est $C_{44}H_{64}O_{19}$
- il s'hydrolyse suivant la réaction :

$$C_{44}H_{64}O_{19} + {}_2H_2O \rightleftharpoons C_{32}H_{48}O_7 + 2\ (C_6H_{10}O_7)$$

et propose la formule suivante :



Cependant, selon ces auteurs, la substance est optiquement inactive.

En 1921, KARRER (30) confirme l'absence de l'azote dans la molécule de l'acide glycyrrhizique, mais n'a pas signalé non plus la déviation optique.

En 1924, TOCCO-TOCCO pour la première fois, compare certains caractères de l'acide glycyrrhizique avec ceux des saponines. L'année suivante (PEYER, 45) confirme cette hypothèse et ajoute le caractère colloïdal de la saponine.

C'est BERGMANN (2) en 1933 qui, le premier, montre que l'acide glycyrrhizique est dextrogyre et donne le pouvoir rotatoire :

$[\alpha]_D^{18} = + 62°,1$ (dans acide acétique aqueux). Ce caractère dextrogyre doit trouver confirmation dans les remarquables travaux de VOSS et ses Collaborateurs.

Ces deux auteurs ont réussi à isoler l'acide glycyrrhizique à l'état pur en utilisant comme matière première la glycyrrhizine commerciale et en reprenant une méthode décrite par HABERMANN (23).

VOSS, en particulier, a préparé les sels, monoammoniacal, mono- et tri- potassique et démontra que tous ces corps sont optiquement actifs.

Après une série de dosages, tant sur les groupements fonctionnels que sur les éléments constitutifs de la matière, VOSS propose pour l'acide glycyrrhizique la formule $C_{42}H_{62}O_{16}$, le désigne comme un acide tribasique et jette pour la première fois les bases d'une isomérisation. Tandis que l'auteur formule quelques réserves quant à la validité des résultats de l'analyse élémentaire, il obtient par contre de réelles satisfactions dans la titration des sels primaires et tertiaires et de la teneur en ammonium, et potassium.

En 1936-37, RUZICKA et ses collaborateurs (52) représente l'étude de la constitution de l'acide glycyrrhizique et bien que ces hauteurs n'étudient que l'aglycone, ils confirment néanmoins la formule $C_{42}H_{62}O_{16}$ proposée par VOSS. Par contre, ces auteurs formulent l'hypothèse d'un polymorphisme: l'aglycone existant sous deux formes α et β qui se transforment facilement l'une dans l'autre selon que la cristallisation dans l'alcool méthylique se faisait lentement ou rapidement.

a) Hydrolyse de l'acide glycyrrhizique

Le problème de l'hydrolyse de l'acide glycyrrhizique a toujours intéressé les chercheurs qui tentent d'établir la formule chimique de cette substance.

Cette hydrolyse conduit à la formation d'une partie osidique et de l'aglycone. Elle se fait généralement par chauffage avec des acides dilués à des concentrations variables, soit à l'air libre, soit à l'autoclave.

KARRER (30) est le premier à s'intéresser principalement à l'aglucone. C'est à lui que revient le mérite d'avoir décrit une bonne méthode pour la préparation de l'acide glycyrrhétinique à partir du bois de réglisse. L'hydrolyse de la saponine est effectuée par KARRER à l'autoclave à 130° avec de l'acide sulfurique à 1 %. ou à la pression ordinaire à l'ébulliton avec de l'acide sulfurique à 3 %. Selon l'auteur, l'opération à l'autoclave donne un meilleur résultat quantitatif et qualitatif.

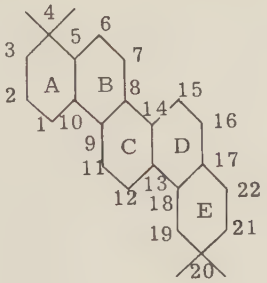
RUZICKA et son Ecole (52) ont essayé l'hydrolyse avec de l'acide sulfurique à 3 % à la pression ordinaire ou en autoclave à 130° selon les prescriptions de KARRER. Ils ont remarqué que l'aglucone obtenu est fortement impur par suite de la présence des produits de décomposition.

Ils ont préconisé une méthode d'hydrolyse plus convenable en chauffant le sel de potassium de l'acide glycyrrhizique dans de l'acide chlorhydrique concentré à 50°C. pendant 15 minutes.

VOSS confirme les remarques faites par RUZICKA au sujet des produits de décomposition au cours de l'hydrolyse.

Ces deux auteurs ont décrit une autre méthode de dissociation par alcoolyse du sel ammoniacal ou potassique par de l'acide chlorhydrique méthanolique. Ils obtiennent un ester méthylique de l'acide glycyrrhétinique en paillettes blanches.

Aglucone - De remarquables travaux ont permis d'identifier d'une manière certaine l'aglucone. Avant d'étudier dans les détails l'élaboration de la structure chimique de cette substance, il convient d'ores et déjà de signaler que l'aglucone, appelé acide glycyrrhétinique, appartient au groupe des composés β - amyrine, pour lequel RUZICKA propose la numérotation suivante du squelette. (Formule I)



Formule I

Formule brute - Au cours de ses essais d'hydrolyse de l'acide glycyrrhizique, KARRER a obtenu un acide glycyrrhétinique fondant à 298° - 300°C. en faisant cristalliser l'aglucone brut à plusieurs reprises dans un mélange

d'éther, d'acide acétique glacial, de ligroïne. Ses analyses l'ont amené à donner la formule $C_{45}H_{72}O_6$ pour l'acide glycyrrhétinique et exclure l'hypothèse de la présence d'azote dans la molécule. Il explique la formule $C_{45}H_{72}O_6$ comme étant celle d'un acide di-oxy-mono-carboxylique. Il base l'hypothèse de deux groupements hydroxyl sur l'analyse de la liaison acétylée. Il décrit en outre un ester méthylique (point de fusion 246°C) et un ester éthylique (point de fusion 246° - 248°C) obtenus par traitement de l'acide glycyrrhétinique avec du diazométhane ou de diazoéthane.

En 1929, RUZICKA et VAN VEEN obtiennent une sapotaline après déshydrogénation de l'acide glycyrrhétinique et montrent sa ressemblance avec les saponines. Depuis cette date, les études systématiques de la formule brute ainsi que les groupements fonctionnels ont démarré.

BERGMANN (2) en 1933 confirme la présence d'un groupement carboxyl, qui à cause de la saponification difficile du méthyl ester était sans doute lié à un carbone tertiaire. L'auteur donne pour l'acide glycyrrhétinique, qu'il appelle acide rhétinique, la formule brute : $C_{23}H_{36}O_3$ ainsi que les caractéristiques suivantes des substances de base :

acide glycyrrhétinique :

Point de fusion : 303°
Pouvoir rotatoire : $[\alpha]$ D = + 145°5 (Dioxane)

ester méthylique de l'acide glycyrrhétinique

Point de fusion : 255°
Pouvoir rotatoire : $[\alpha]$ D = + 165°3 (Dioxane)

acide acétyl glycyrrhétinique :

Point de fusion : 317° - 318°
Pouvoir rotatoire : $[\alpha]$ D = + 144°5 (Chloroforme)

ester méthylique de l'acide acétyl glycyrrhétinique :

Point de fusion : 299° - 300°
Pouvoir rotatoire : $[\alpha]$ D = + 147°6 (benzène)

Il trouve seulement un groupement hydroxyl mais ne donne aucune indication sur la présence d'une double liaison, ce qu'on pouvait attendre d'une saponine.

VOSS en 1936 (72) rapporte le premier la formule $C_{30}H_{46}O_4$ pour l'acide glycyrrhétinique. Cette formule est confirmée presque au même moment par RUZICKA et LEUENBERGER. Ces derniers ont noté deux formes cristallines avec des points de fusion de 287° - 293°C et 300° - 304°C, formées respectivement par cristallisation lente ou rapide qu'ils considèrent comme des modifications polymorphes, car les deux formes peuvent se transformer facilement l'une dans l'autre par recristallisation. Ils observent aussi une réaction négative (avec le tétranitrométhane) de la double liaison.

En 1937, E. BERGMANN et F. BERGMANN (3) ont cherché à défendre la formule en C_{23} mais quand ils ont isolé le triméthylpicène $C_{25}H_{20}$ à partir des produits de déshydrogénation de l'acide glycyrrhétinique par le sélénium, ils renoncent à la formule en C_{23}.

Dans la même année, VOSS et ses collaborateurs apportent les preuves solides en faveur de la formule en C_{30} qui trouve confirmation dans les travaux d'un groupe de chercheurs japonais KARYONE et NONAKA (32).

- Squelette de base - La détermination du squelette de base s'appuie sur les trois méthodes fondamentales applicables à la chimie des terpènes en général et des triterpènes en particulier (LEUENBERGER, 35).

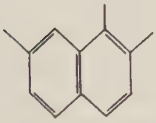
- la désagradation
- la déshydrogénation
- la règle des isoprènes.

La déshydrogénation notamment, joue un rôle prépondérant dans les triterpènes. Sa valeur à l'intérieur de cette classe de produits naturels est cependant variable. Encouragés par les succès obtenus dans l'étude des amyrines, plusieurs auteurs ont tenté et réussi à déshydrogéner l'acide glycyrrhétinique. C'est ainsi qu'une déshydrogénation au sélénium à 340° - 345°C a donné, selon LEUENBERGER (35) 10 % de sapotaline (triméthyl-naphtaline 1.2.7) (formule II), 2 % de diméthyl-naphtaline 2.7 (formule III), et une très petite quantité de diméthylpicène 1.8 (formule IV). E. et F. BERGMANN (3) ont trouvé le sapotaline et le diméthylpicène 1.8. tandis que KARYONE et NONAKA (31) dans la même opération ont trouvé la diméthylnaphtaline 2.7 et la sapotaline.

LEUENBERGER a proposé la structure suivante pour l'acide glycyrrhétinique (formule V).

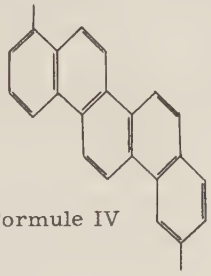
Groupements fonctionnels

- Groupement hydroxyl : L'école de VOSS et celle de RUZICKA décrivent l'aglycone comme un mono-hydroxycarboxylique du type $C_{29}H_{44}O$ - OH - COOH, les quatre atomes d'oxygène sont localisés dans une liaison éther - oxyde.

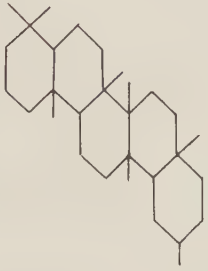


Formule II

Formule III

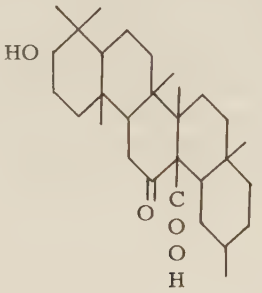


Formule IV



Formule V
Squelette de base proposé par LEUENBERGER

- Le groupement cétone α , β non saturé - Il convient de préciser la liaison du quatrième atome d'oxygène ainsi que l'existence d'une double liaison. L'état de cette question s'est éclairci lorsque RUZICKA et COHEN (54) eurent observé un spectre d'absorption spécifique dans l'ultraviolet avec un maximum situé à 250 mμ. Un maximum d'absorption similaire était déjà signalé à propos de l'acide céto oléanolique et se trouvait être caractéristique de la présence d'un groupement cétone - α , β non saturé. Une structure est alors suggérée pour l'acide céto-oléanolique par RUZICKA et COHEN (formule VI) ; l'acide glycyrrhétinique ayant la même formule brute et le même groupement fonctionnel serait alors isomère de l'acide céto-oléanolique.



Formule VI : acide céto-oléanolique, isomère de l'acide glycyrrhétinique (RUZICKA et COHEN, 1937).

La présence d'un tel groupement cétone α , β non saturé expliquerait l'échec des réactions sur la double liaison et sur le groupement carbonyle : les deux groupements se masquent mutuellement.

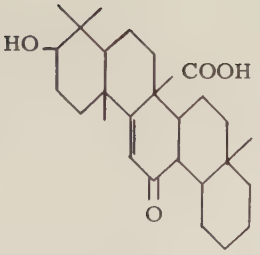
Position du groupement cétone α, β non saturé

RUZICKA et MARXER, en 1939, ont converti par hydrolyse catalytique l'acide glycyrrhétinique en dérivé déoxy. Dans ce dérivé l'oxygène du groupement cétonique a été substitué par un hydrogène alors que la double liaison est épargnée. L'acide déoxyglycyrrhétinique (isomère de l'acide oléanolique) peut être transformé en β-amyrine ; il devient probable que l'acide glycyrrhétinique et l'acide céto oléanolique constituent des isomères de position par rapport au groupement carbonyl.

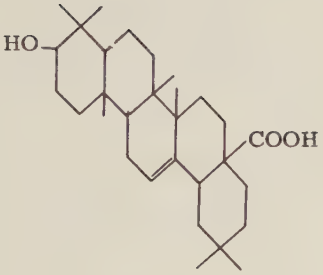
Parmi les produits neutres obtenus par oxydation de l'acide désoxoglycyrrhétinique acétylique par l'acide chromique, on trouve une cétolactone. Ceci laisse donc supposer que le groupement carbonyl est situé sur un atome de carbone en position conjuguée avec la double liaison, présente sur le cycle C. Ces considérations ont conduit RUZICKA et MARXER à admettre pour l'acide glycyrrhétinique la formule suivante : (Formule VII).

Cependant HARWORTH (1937) (24) propose une structure pour l'acide céto oléanolique correspondant à celle de l'acide oléanolique indiquée par KITASATO (33) (formules VIII et IX).

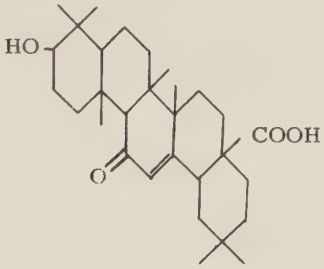
A la suite de ce travail, RUZICKA et MARXER (55) adoptent la représentation suivante de l'acide glycyrrhétinique (formule X).



Formule VII : Acide glycyrrhétinique
RUZICKA et MARXER, 1939.



Formule VIII
Acide oléanolique
KITASATO



Formule IX
Acide céto oléanolique
HARWORTH

- Groupement carboxyl - Alors que les recherches que nous venons de décrire sont effectuées sur des bases expérimentales purement chimiques, des chercheurs anglais entreprennent l'étude de la structure des acides triterpéniques à l'aide des déterminations physico-chimiques. C'est ainsi que les recherches de BILHAM et ses collaborateurs (8) conduisent à localiser le groupement carboxyle sur le cycle E, contrairement à l'opinion de HAWORTH. La double liaison présente dans les acides du groupe amyrine serait alors située dans le cycle D. La formule suivante (formule XI) doit être adoptée pour l'acide oléanolique.

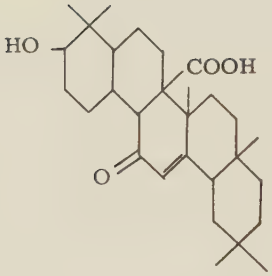
Se basant sur l'hypothèse selon laquelle l'acide céto oléanolique et l'acide glycyrrhétique seraient épimères, BILHAM suggère pour l'acide glycyrrhétinique la formule suivante : (formule XII), formule qui est également retenue par KON et ROSS.

En 1943, RUZICKA, JEGER et WINTER (56) critiquent la structure proposée par les auteurs anglais et démontrent que l'emplacement de la double liaison et celui du groupement carboxyl ne peuvent être sur deux cycles différents.

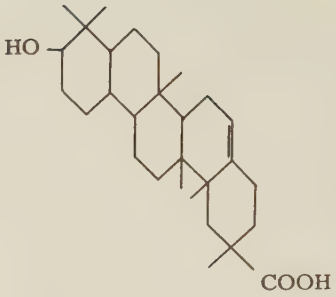
Les récents résultats de DJERASSI et FOLTZ (1954) (13) en accord avec ceux de RUZICKA conduisent finalement à la formule ci-dessous (formule XIII).

Isomérie et polymorphie

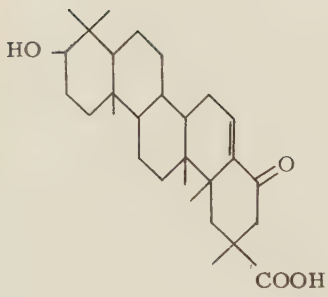
Si la structure de l'acide glycyrrhétinique semble, à l'heure actuelle



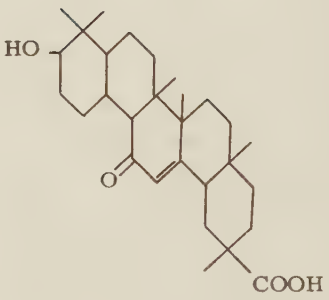
Formule X
Acide glycyrrhétinique
RUZICKA et MARXER
(1939)



Formule XI
Acide oléanolique
BILHAM et Coll.
(1942)



Formule XII
Acide glycyrrhétinique
KON et ROSS-1942



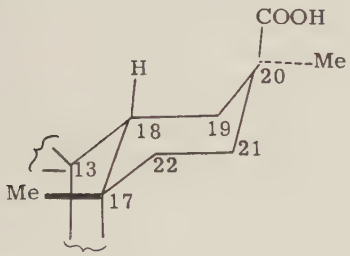
Formule XIII
Acide glycyrrhétinique
RUZICKA et JEGER

être déterminée, les contradictions persistent quant à la question de polymorphie ou de l'isomérie. VOSS (72) est le premier auteur à avoir attiré l'attention sur le fait que pour les aglucones de l'acide glycyrrhizique il fallait admettre la possibilité des isomères. Par méthanolyse chlorhydrique du sel mono-ammoniacal de l'acide glycyrrhizique cet auteur obtient un mélange d'esters qu'il sépare ensuite en ester méthylique d'acide glycyrrhétinique (de point de fusion 224°6 - 227° et de pouvoir rotatoire + 124°6 dans le chloroforme) et en ester méthylique d'acide glycyrrhétinique β (de point de fusion 255° et de pouvoir spécifique + 152° dans le chloroforme), ce dernier étant en faible quantité.

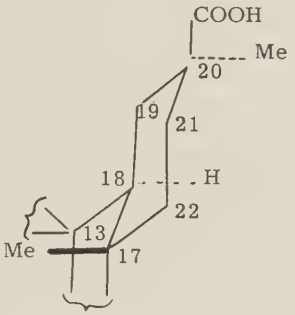
Par hydrolyse, VOSS, isole un acide glycyrrhétinique de point de fusion 283°C, dénommé acide glycyrrhétinique α ; l'auteur décrit en outre l'acide glycyrrhétinique β comme un produit fondant à 296°C.

De leur côté, RUZICKA et ses collaborateurs procèdent à l'hydrolyse du glucoside par l'acide chlorhydrique concentré. Ils obtiennent après une rapide purification un acide glycyrrhétinique dont le point de fusion est suivant les conditions de cristallisation, 287° - 293° ou 300° - 304°. Ces deux formes d'acide glycyrrhétinique ont le même pouvoir rotatoire spécifique et peuvent être converties l'une dans l'autre. Ces auteurs concluent qu'il s'agit bien d'une polymorphie.

Récemment, BEATON et SPRING (1) ont décrit un acide glycyrrhétinique (18 α) dont le point de fusion serait compris entre 331° et 335°C. Ce produit a été préparé par hydrolyse alcaline du méthyl-glycyrrhétinate et aussi par chauffage de l'acide glycyrrhétinique avec de l'acide acétique glacial et de l'acide chlorhydrique concentré. Ils ont conclu que le groupement carboxyl dans l'acide glycyrrhétinique est orienté β et axial, tandis que dans l'acide glycyrrhétinique 18 α ce groupement carbonyl est équatorial.



Formule
AG normal
BEATON et SPRING



Formule
18 α
BEATON et SPRING

Cette conclusion les amène à suggérer que les isomères décrits par VOSS et les formes décrites par RUZICKA et LEUENBERGER pourraient être en partie constitués par un mélange d'acide glycyrrhétinique et d'acide 18 α .

Il est difficile à l'heure actuelle de démontrer et d'identifier les isomères de l'acide glycyrrhétinique. Il est probable qu'il existe plus de deux isomères mais l'ensemble des résultats donnés par différents auteurs ne permet pas de tirer une conclusion nette, les écarts de chiffres étant trop grands.

Récemment les auteurs anglais, la plupart biochimistes et pharmacologistes prétendent identifier l'existence de certains isomères, qu'ils dénomment "isomères actifs" qui sont les seuls efficaces comme agent anti-inflammatoire.

Nous n'avons malheureusement pas de données chimiques et physiques concernant ces isomères pour pouvoir essayer essayer de faire un rapprochement avec les formes α et β décrites par VOSS voire la forme 18 α décrite par SPRING.

Partie osidique

Le problème de polymorphie et de l'isomérie excepté, on peut consi-

dérer que la nature de la partie agluconique comme élucidée. Par contre, rien ne pouvait être établi avec certitude sur la constitution de la partie osidique ; les travaux sur cette partie sont beaucoup moins nombreux que ceux concernant l'aglucone.

GRIESSMEYER, le premier (21) a observé que l'ébulliton avec des sels minéraux étendus et même une ébullition simple avec de l'eau donne à côté de l'acide glycyrrhétinique, un sucre fermentescible. HABERMANN (23) donne une description plus précise de ce sucre. En faisant bouillir pendant 5 heures l'acide glycyrrhizique ou son sel ammoniacal avec de l'acide sulfurique étendu, il obtient un sirop "d'acide saccharique carboxylique" dont il isole deux sels de baryum différents : $C_6H_9O_8$ 1/2 Ba et $C_6H_8O_8Ba$. HABERMANN croit donc à un acide parasaccharique. Les travaux plus poussés de TSCHIRSH et CEDEBERG (66) identifient l'élément osidique comme de l'acide uronique et pour des raisons d'analogie comme de l'acide glucuronique sans cependant exclure les isomères de position.

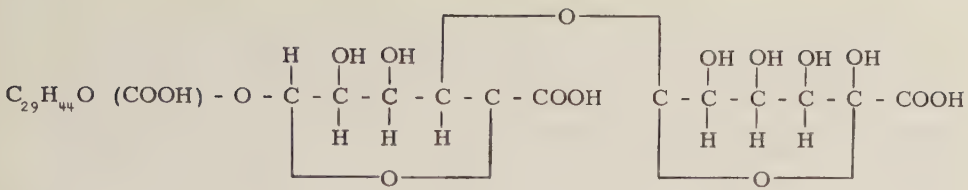
Cette hypothèse est démontrée l'année suivante comme plausible par TSCHIRSH et GAUCHMANN (67). De la solution alcoolique de la partie sucre obtenue par hydrolyse acide, ces auteurs ont isolé une substance cristalline qu'ils considèrent comme de l'acide glucuronique. Les cristaux suintent à 150°C et commencent à brunir. Ils fondent à 160° - 170°C en se décomposant. Bien qu'un certain nombre de réactions d'identification, par exemple la réaction à la naphtorésorcine et la formation du furfurol avec de l'acide chlorhydrique, sur lesquelles cette conclusion est basée, ne soient pas spécifiques, pendant longtemps, on a admis l'hypothèse de TSCHIRSH.

Vingt ans plus tard, GALASSI (1927) (17) émet l'opinion selon laquelle la partie sucre n'est pas l'acide uronique mais l'acide gluconique.

Le premier ouvrage dans lequel il est de nouveau question de l'élément osidique est celui de F. BERGMANN (2). Cet auteur considère cet élément sucré comme de l'acide mannuronique en se basant sur le pouvoir rotatoire de son sel de baryum qui est : $[\alpha]_D^{21}$ = - 6°5 ; C. NIEMANN et K. P. LINK (42) ont trouvé le pouvoir rotatoire de ce même sel : $[\alpha]_D$ = - 4°C.

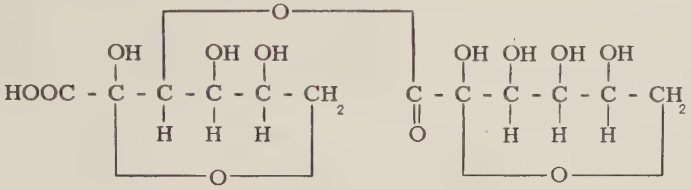
VOSS et PFIRSCKE (74) démontrent que l'acide glucuronique ne peut être l'élément sucré de l'acide glycyrrhizique. Les auteurs sont parvenus pour la première fois à préparer un acide diuronique qu'ils ont isolé sous forme d'ester diméthylique en fines aiguilles, en employant l'alcoolyse au moyen de l'alcool méthylique et de l'acide chlorhydrique.

Comme F. BERGMANN, VOSS et PFIRSCHKE estiment qu'il s'agit d'acide mannuronique. Outre le sel de baryum $[\alpha]_D^{14}$ = - 5°2 ils ont préparé le sel de brucine dont le pouvoir rotatoire trouvé est : $[\alpha]_D^{19}$ = - 26°9 C. (solvant = eau). Le sel de brucine de l'acide mannuronique a un pouvoir rotatoire spécifique : $[\alpha]_D$ = - 23°1. Cette différence non négligeable jointe à celle des points de fusion (sel de brucine de VOSS = 180°C, sel de brucine théorique = 147°C), restent cependant inexplicables pour eux. VOSS a néanmoins proposé la formule suivante pour l'acide glycyrrhizique (formule XVI)



Formule XVI (VOSS et PFIRSCHKE, 1937)

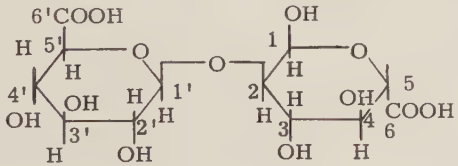
RINGEL (1939) (52) fait une étude plus poussée pour éclaircir la nature du résidu sucré et en vient à croire que deux molécules d'un acide 2 cétohexonique sont présentes (formule XVII)



Formule XVII - RINGEL (1939)

Il trouve alors une explication au fait qu'il était impossible d'obtenir un sel trisodique à partir de l'acide glycyrrhizique, mais un sel diammoniacal seulement, l'un des groupements carboxyliques ayant un caractère spécial ; ou alors peut-être, un groupement phénolique est présent dans la partie sucre. Cependant les observations spectrophotométriques et polarographiques ont montré l'existence d'un groupement hydroxyl énolique dans l'aglycone comme l'a suggéré NIEMANN (1952) (42) ; il devient plausible que ceci est dû à la troisième fonction acide. C'est pour cette raison que la formule de RINGEL trouve difficilement une base solide.

La constitution du dissacharide est étudiée plus tard par LYTHGOE et TRIPPETT (1950) (38). Ces auteurs ont trouvé deux restes d'acide glycopyruronique liés par la liaison β 1' : 2 - (formule XVIII).



Formule XVIII
LYTHGOE et TRIPPETT (1950)

Ainsi deux acides glucuroniques liés 1' - 2 sont présents à côté de l'acide glycyrrhétinique. La liaison entre la partie osidique et l'aglycone se fait en α comme l'a suggéré VOSS

D - PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES

1) Sucs de réglisse et gastrites

Depuis que REVERS en 1946 (48) a découvert l'effet thérapeutique du suc de réglisse sur l'ulcère de l'estomac, l'utilisation médicale de ce produit a pris un essor considérable.

Néanmoins les avis sont partagés quant au mécanisme d'action de l'extrait. VERUYEN (69) pense que l'influence favorable du suc de réglisse est due à son action spasmolytique. Cette action a été démontrée sur les rats. Quelque temps après, REVERS (49) constate qu'un traitement avec des doses non contrôlées du suc produit, dans 20 pour cent des cas, un effet secondaire occasionnant un oedème de la face, des extrémités accompagnant des maux de tête et parfois des étourdissements. Des recherches pharmacologiques plus poussées de BIJLSMA et Coll. (7) et de NELEMANS STAMPERIUS (43) n'ont pas permis d'identifier le facteur causal de l'oedème. Il apparaît de même que la substance spasmolytique du suc de réglisse n'est pas identifiable à la glycyrrhizine. D'autres chercheurs, notamment SCHULZE et FRANKE (59) STAUDNER (63) SCHULZE (58) ont confirmé l'action curative du suc de réglisse, mais les discordances persistent au sujet du ou des principes actifs.

Tandis que NELEMANS - STAMPIRIUS et REVERS excluent l'efficacité de la glycyrrhizine, des recherches plus récentes de SCHULZE (58) SCHULZE et Coll. (59) NITSCHKOFF (44) et SCHRUFFER (60) plaident en faveur de ce composé.

Selon CZOK et KREIENGERG (12) la drogue régulariserait la sécrétion d'acide chlorhydrique de l'estomac.

KANOUI (32), KANOUI, GUYET et MARTEAU (32) pensent qu'une déglycyrrhizination du suc permet d'exclure tous les produits "toxiques". Leurs travaux tendent à montrer une action protectrice du suc déglycyrrhiziné contre l'agression digestive de la phénylbutazone.

Loin de nous l'idée de discuter sur les travaux de ces auteurs qui sont d'ailleurs remarquables, il nous est permis toutefois de constater lors de nos recherches sur la chimie de la réglisse, qu'il est extrêmement difficile d'obtenir dans les conditions habituelles de manipulation, un suc déglycyrrhiziné.

Madame POINTET-GUILLOT (thèse Pharmacie Paris, 1958) attribue à des dérivés flavoniques et précise les actions spasmolytique et protectrice de ces glucosides dans l'ulcère de l'estomac sans avoir déterminé la teneur du suc de réglisse en ces composés.

Réglisse et acétylcholine

Au cours de ses études sur les rapports entre les actions pharmacologiques de la réglisse et de l'acétylcholine, VINCENT (71) constate que :

1) Une décoction de la réglisse en injection intraveineuse chez le chien chloralosé, possède une nette action hypotensive d'intensité, de durée variables selon les doses et les sujets en expérience.

2) Cet effet n'est pas dû à la présence de l'acétylcholine dans la drogue.

3) La réglisse possède "in vitro" un notable mais léger pouvoir inhibiteur sur la cholinestérase sérique et sur la cholinestérase du système nerveux.

4) Vis-à-vis des effets pharmacologiques de l'acétylcholine, la réglisse se comporte comme un inhibiteur. Elle diminue légèrement (et de façon fugace) les effets hypotenseurs de l'acétylcholine injectée par voie veineuse chez le chien chloralosé. La réponse du muscle dorsal de la sangsue est légèrement diminuée après action de la réglisse.

L'effet inhibiteur est total vis-à-vis de l'action de l'acétylcholine sur l'intestin isolé du cobaye.

Activité hormonale de la réglisse

En étudiant la cause de l'oedème provoqué par une administration surdosée du suc de réglisse, BORST et Coll. (9) ont fait une découverte très intéressante, à savoir que la réglisse a une grande influence sur le métabolisme de l'eau et des électrolytes. L'administration journalière de 20 à 40 g. d'extrait aux patients, provoque une rétention d'eau, de sodium, de chlorure, tandis que l'excrétion du potassium est énormément accrue. Ce groupe de chercheurs conclut que l'administration orale du suc de réglisse est dans beaucoup de cas, semblable à celle, par voie intraveineuse de la désoxycorticostérone. Cette activité suggère l'administration de réglisse dans le traitement de la maladie d'Addison. GROEN (22) parvint à garder en vie des Addisonniens en les traitant seulement avec des doses convenables de réglisse. Cette action hormonale a été confirmée par plusieurs auteurs, mais on doit souligner que, l'action corticoide est surtout due à l'acide glycyrrhizique et plus spécialement à son aglycone : l'acide glycyrrhétinique.

Enfin, citons les propriétés édulcorantes et expectorantes du suc de réglisse. Mais ces propriétés sont connues et utilisées depuis si longtemps qu'il nous semble inutile de les décrire.

2) Acide glycyrrhizique

a) Propriété hémolytique

Les travaux de TOCCO TOCCO ont apporté une contribution à la connaissance des relations entre l'activité physiologique et les propriétés physiques. Cet auteur a déclaré que le principe actif de la glycyrrhizine, même en dilution de 1/2 000 a une action hémolytique pendant environ 2 heures, mais celle-ci est imparfaite en une dilution de 1/4 000 au bout de 6 heures.

Cependant KUHLE, HALBER, KANN, KOBERT, considèrent que l'acide glycyrrhizique ainsi que son sel de sodium n'ont aucune action hémolytique.

Il nous semble que ces opinions contradictoires proviennent du fait que l'on n'avait pas pu isoler à l'état pur l'acide glycyrrhizique d'une part, et une saponine hémolysante décrite par KOBERT d'autre part (39).

b) Fixation de la toxine du tétanos

D'après VELLUZ,(68) la glycyrrhizine possède la propriété remarquable de fixer la toxine du tétanos à haute dose et par conséquent, de la rendre inoffensive. Si l'on mélange la toxine du tétanos, qui déjà à une dose de 1/800 de cm^3 est mortelle (pour l'homme) à une solution de 0,5 % de glycyrrhizate d'ammonium, cette solution, au bout de quatre heures à 38° - 39°C n'est plus mortelle pour le cobaye.

E - AUTRES PLANTES CONTENANT DE LA GLYCYRRHIZINE

La glycyrrhizine peut se trouver dans d'autres espèces botaniques. La plupart d'entre elles sont faiblement ou pas du tout rattachées au glycyrrhiza glabra.

Les plantes "réglisse" indiennes ou brésiliennes, Abrus precatorius et

Périandra dulcis, appartiennent elles aussi à la famille des Légumineuses - Papilionnacées. La présence de la glycyrrhizine dans Periandra dulcis a été démontrée en 1827, par BERZELIUS. La quantité trouvée est cependant faible : 0,4 % (1941 - MACHADO). Selon TSCHIRCH et GAUCHMANN (1908) le Periandia mediteranea européen contient aussi de la glycyrrhizine.

Dans les arbres tels que Lucuma Glycyphylla, Achras sapota, Sederoxylon richardii, on rapporte qu'il y a de la glycyrrhizine dans l'écorce. Dans la réglisse appelée américaine ou fougère de réglisse, Polypodium occidentale (P. vulgare var. occidentalis) qui pousse le long de la côte occidentale de l'Amérique, FISCHER et GOODRICH (1930) ont trouvé approximativement 2,4 % de glycyrrhizine sur les rhizômes sèches.

Par contre, FISCHER et LYNN (1933) n'ont pas réussi à la trouver dans la réglisse "sauvage" (G. LEPIDATA).

Les méthodes d'identification et de dosage de la glycyrrhizine n'étant pas spécifiques, il faut considérer avec beaucoup de réserves la plupart des hypothèses concernant la présence de la glycyrrhizine dans d'autres espèces végétales que la réglisse elle-même.

TRAVAUX PERSONNELS

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ACIDE GLYCYRRHIZIQUE ET DE SES PRODUITS D'HYDROLYSE

CHAPITRE I

ÉVALUATION DE LA TENEUR EN ACIDE GLYCYRRHIZIQUE

I - GENERALITES

Depuis de longues années, on poursuivait les recherches pour essayer d'établir les méthodes de dosage de l'acide glycyrrhizique ou de la glycyrrhizine, substance considérée naguère comme étant le seul principe actif de la réglisse. Cependant, soit que les méthodes utilisées ne sont pas suffisamment spécifiques, soit que les constantes physiques et chimiques de la matière dosée restent vagues, les résultats obtenus sont très variables.

LINZ en 1916 (36), VITARELLE en 1938 (70), WIEST en 1949 (77) et plus récemment Madame POINTET-GUILLOT (47) ont procédé à un examen complet des techniques connues. Ces auteurs se sont aperçus que la glycyrrhizine est une substance très difficile à doser, tant dans la racine de réglisse que dans l'extrait.

On peut classer les procédés de dosage utilisés jusqu'à ce jour en divers groupes :

- dosages gravimétriques
- dosages colorimétriques
- dosages physiologiques
- dosage polarographique.

Les méthodes physiologiques qui sont basées d'une part, sur l'index hémolytique, d'autre part sur la saveur sucrée de la glycyrrhizine, sont d'une application difficile et d'une précision douteuse. Quant à la méthode polarographique préconisée par NIEMAN (42) elle semble reposer sur un principe élégant et d'une précision convenable. Malheureusement nous n'avons pas pu l'étudier, faute de matériel adequat.

Nous allons examiner les méthodes gravimétriques, en nous limitant toutefois à celles du Codex et de HOUSEMAN (26) puis les dosages colorimétriques. Nous ajouterons la méthode spectrophotométrique à la mise au point de laquelle nous avons contribué. Un tableau résumé des résultats obtenus nous permettra, enfin de faire quelques commentaires.

II - DOSAGE PAR GRAVIMETRIE

Le principe général de ces méthodes consiste à précipiter l'acide glycyrrhizique à partir des solutions aqueuses de sels d'ammonium plus ou moins purifiées, par addition d'un acide minéral fort (le plus souvent on utilise l'acide sulfurique, rarement l'acide chlorhydrique). On recueille le précipité, le lave, le sèche et le pèse, soit directement, soit après transformation en glycyrrhizate d'ammonium.

A - Méthode de la Pharmacopée française

Cette méthode figure au Codex de 1949 (p. 320 - 321) à l'article "Extrait brut de réglisse".

L'extraction se fait en milieu aqueux ammoniacal. L'extrait aqueux de réglisse est additionné de l'acide sulfurique qui précipite la glycyrrhizine ; le précipité est repris par l'eau ammoniacale qui est ensuite évaporée à sec. Le résidu sec est pesé.

Technique - On dissout trois grammes d'extrait préalablement desséché à 100°C dans 30 ml d'eau distillée additionnée de V gouttes d'ammoniaque. On filtre et on recueille 20 ml du filtrat correspondant à 2 g. du produit desséché. Ajouter à ce filtrat 2,5 ml d'acide sulfurique officinal. Laisser en contact 24 heures. Décanter sur un filtre à pli le liquide limpide. Laver le résidu sur le même filtre avec 30 ml d'eau distillée employés en plusieurs fois. Le dissoudre alors dans 2 ml d'ammoniaque officinale. Laver fiole et filtre avec de l'eau distillée contenant V gouttes d'ammoniaque pour 10 ml d'eau, jusqu'à ce que le liquide filtré soit incolore. Evaporer le filtrat au B.M. dans un cristallisoir taré qui sera ensuite placé une heure à l'étuve à 100°C et peser.

Essai sur le suc de réglisse - Un échantillon de suc de réglisse portant la marque "TK" des Etablissements Réglisse ZAN a été examiné. L'opération porte sur trois prises d'essai de 3 g. chacune.

Essai 1 : 34,35 % de glycyrrhizate d'ammonium
Essai 2 : 26,61 % " "
Essai 3 : 45,27 % " "

La grande différence entre les résultats obtenus sur le même échantillon de suc nous incite à faire les remarques suivantes, remarques qui ont été d'ailleurs faites par Madame POINTET-GUILLOT (47) :

- la solution aqueuse de suc, à cause de la présence des matières gommeuses et albuminoides, est très difficile à filtrer. Le filtre est très vite colmaté.

- le Codex préconise d'ajouter 0,04 g au poids obtenu, chiffre qui correspondrait à la quantité de glycyrrhizine restant en solution dans les eaux mères et dans les eaux de lavage. Ce chiffre est arbitraire.

- la technique manque de spécificité et de précision car elle permet l'extraction et la précipitation des substances autres que l'acide glycyrrhizique. Les chiffres indiqués ci-dessus sont assez éloquents.

B - Méthode de ROUSSMAN (26)

L'auteur utilise l'éther sulfurique pour enlever la résine puis extrait la glycyrrhizine par l'alcool à 75 %. La liqueur alcoolique évaporée à sec est reprise par de l'eau distillée. On précipite l'acide glycyrrhizique par l'acide sulfurique ; on lave le précipité, le sèche et le pèse.

Technique

La racine de réglisse est broyée jusqu'à passer au tamis de 20 à 30 mailles. On la dessèche à basse température jusqu'à ce que l'humidité soit inférieure à 2 %.

Sur une prise d'essai de 3 g., on extrait la résine à l'éther. Cette opération se fait dans un tube à centrifuger de 100 ml. La quantité d'éther utilisée est égale à trois fois 75 ml.

Après extraction de la résine, la racine est desséchée puis mélangée dans un tube à centrifuger avec 75 ml d'alcool à 75 % en volume. La macération de la racine dans l'alcool dure 3 heures ou de préférence une nuit ; le tube est alors centrifugé pendant 15 minutes à 1500 t/min. La solution limpide est versée dans un flacon, le dépôt mélangé à nouveau à 75 ml d'alcool à 75 %. On procède à un troisième traitement identique aux deux premiers. Les trois liqueurs alcooliques réunies sont évaporées à siccité sous vide de préférence. Le résidu resté dans le flacon est dissout dans 10 ml d'eau chaude et la solution est filtrée sur un petit filtre à plis. Le filtrat est recueilli dans un tube à centrifuger portant un repère à 20 ml. Le flacon est lavé ainsi que le filtre, et le volume est ajusté à 20. On refroidit le filtrat à 15°C et on précipite l'acide glycyrrhizique par 3 ml d'acide sulfurique à 10 % en poids. Le tube est abandonné à la glacière pendant une nuit. On centrifuge puis on lave le précipité trois fois avec un mélange eau-éther. On ajoute à l'aice glycyrrhizique lavé 30 ml d'alcool 95° chaud. Le liquide recueilli dans une capsule tarée, additionné de 11 gouttes d'ammoniaque à 5 %, évaporé à sec, séché à l'étuve à 100°C pendant une nuit et pesé.

Dosage sur le suc - On opère exactement comme sur le bois. Cependant il n'est pas nécessaire d'extraire par l'éther les résines dont la plus grande partie a été retenue dans le bois au cours de l'extraction.

Essais sur la racine et sur le suc - Le lot de racine qui nous a été fourni est de provenance d'Anatolie. Le suc TK dosé est le même que celui utilisé dans la méthode du Codex. Les résultats sont reproduits dans le tableau suivant.

Tableau III

Dosage par la méthode de HOUSEMAN

Essai	Glycyrrhizine (g. pour 100 g. de)	
	racine	suc TK
1	10,12	23,93
2	9,73	24,05
3	9,90	24,12

C - Remarques sur les méthodes de dosage par gravimétrie

Nous ne voulons pas, dans le cadre de nos études, citer toutes les méthodes gravimétriques décrites dans la littérature, méthodes qui ne dif-

fèrent d'ailleurs les unes des autres que par certains détails. Il nous est permis cependant de constater que le précipité obtenu par l'acide sulfurique ne représente pas l'acide glycyrrhizique à l'état pur, mais un mélange de plusieurs substances.

On se contentera, toutefois, dans la pratique courante d'appliquer la méthode de HOUSEMAN qui, si elle manque de spécificité, donne des résultats constants.

III - DOSAGE PAR COLORIMETRIE

Le principe général de ces méthodes repose sur le dosage colorimétrique des produits obtenus par hydrolyse de l'acide glycyrrhizique. Il y a donc lieu de distinguer deux procédés différents : l'un consiste à doser la partie osidique, l'autre, l'aglucone.

A - Dosage de la partie osidique

Cette méthode colorimétrique proposée par FUCHS (15) dose les acides uroniques libérés après hydrolyse de l'acide glycyrrhizique.

La drogue pulvérisée est épuisée par l'alcool chlorhydrique et la glycyrrhizine est précipitée par l'acétate de plomb. Elle est alors soumise à l'hydrolyse. La réaction colorée est pratiquée sur la solution aqueuse acide en présence de naphtorésorcinol et d'acide chlorhydrique concentré. La coloration mauve développée est extraite par l'éther. On fait la lecture à la longueur d'onde de 565 mμ.

Technique

Epuiser 0,2 g de poudre de racine de réglisse avec 50 ml d'un mélange de 100 parties d'alcool à 50 % et deux parties d'acide chlorhydrique à 2 % pendant une heure en agitant souvent et énergiquement. Filtrer sur un filtre sec. Prélever 10 ml de filtrat, verser dans un tube à centrifuger, ajouter 0,4 ml d'une solution aqueuse saturée d'acétate neutre de plomb, bien mélanger, centrifuger le précipité obtenu. Le laver deux fois avec 10 ml d'alcool à 50 %. Transvaser le précipité plombique avec 30 ml d'acide sulfurique à 3 % (10 + 10 + 5 + 5) dans un petit ballon à fond rond d'une contenance de 75 ml et porter à l'ébullition pendant 4 heures à reflux. Après refroidissement verser la liqueur d'hydrolyse dans un ballon jaugé de 50 ml, compléter au trait de jauge. Filtrer sur filtre sec. Prélever avec une pipette 0,5 ml ou 1,0 ml (correspondant respectivement à 0,400 g et 0,800 g de drogue). Verser dans un tube à essai à paroi épaisse muni d'un tube ascendant. Compléter à 2 ml avec l'eau. Ajouter 2 ml d'une solution aqueuse à 0,1 % de naphtorésorcinol fraîchement préparée et filtrée, 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (d = 1,19). Chauffer au bain-marie pendant 4 heures. Refroidir sous courant d'eau froide ; la coloration mauve formée, après addition de 2 ml d'alcool à 95° est épuisée par 10 + 5 ml d'éther pur sans peroxyde. Les solutions éthérées sont réunies et complétées à 15 ml (clarifier par du sulfate de sodium anhydre si la solution est trouble). La lecture se fait contre témoin composé du naphtorésorcinol et d'acide chlorhydrique, au photocolorimètre à la longueur d'onde de 565 mμ.

Les échantillons de racine et de suc utilisés pour le dosage par la méthode de HOUSEMAN ont été examinés par cette méthode.

La gamme-étalon est constituée par des quantités croissantes de 10 à 50 γ d'acide d-glucuronique.

Résultats

Tableau IV

Dosage de la racine et du suc de réglisse par la méthode de FUCHS

Essai	Glycyrrhizine g. pour 100 g de	
	Racine	Suc TK
1	7,82	20,98
2	7,79	21,73
3	7,79	21,06

B - Dosage de l'aglucone

Cette méthode proposée par WIEST (77) dose l'aglucone libéré par hydrolyse de l'acide glycyrrhizique, la coloration étant obtenue avec la vanilline en milieu sulfurique concentré. D'après l'auteur, la réaction serait due à la présence d'un OH phénolique sur le noyau triterpénique. Elle n'est pas spécifique des triterpènes, mais peut être appliquée en l'absence de stérols.

Technique

Un gramme de racine de réglisse est épuisé par 100 ml d'alcool à 50° contenant 0,4 ml d'acide chlorhydrique à 10 % en agitant mécaniquement.

Après filtration, on verse 50 ml de la solution dans un tube à centrifuger, on additionne 5 ml d'une solution aqueuse saturée d'acétate neutre de plomb. Le précipité, centrifugé, lavé deux fois par 10 ml d'alcool à 50°, est mis en suspension dans 50 ml d'acide sulfurique à 3 % en poids et hydrolysé pendant 4 heures, à l'ébullition à reflux. Après refroidissement l'acide glycyrrhétinique formé est extrait par du chloroforme en agitant plusieurs fois dans une ampoule à décantation. Les solutions chloroformiques réunies sont lavées avec 10 ml d'eau distillée, déshydratées ensuite en présence du sulfate de sodium anhydre filtrées et évaporées à sec. Le résidu desséché est dissous dans 10 ml d'acide sulfurique concentré, mesurés à la burette. On prélève exactement 5 ml de cette solution et on les ajoute à 25 ml de solution alcoolique de vanilline à 2 % maintenue dans un bain d'eau glacée. On agite et on laisse à l'obscurité, dans le bain d'eau glacée pendant 20 minutes. La lecture se fait à la longueur d'onde de 550 mμ.
Courbe étalon : constituée par des doses croissantes d'acide glycyrrhétinique pur, de 1 à 5 mg.
Résultats obtenus sur les échantillons de racine et de suc cités plus haut (Tableau V).

C - Remarques sur les méthodes de dosage par colorimétrie

La méthode de WIEST donne des résultats par défaut par rapport à la méthode de FUCHS. Les conditions de l'hydrolyse sont sensiblement identiques ; nous pensons que dans la méthode de WIEST, l'extraction de l'aglucone par le chloroforme pourrait entraîner des pertes.

Tableau V

Dosage par la méthode de WIEST.

Essai	Glycyrrhizine (g. pour 100 g de)	
	Racine	Suc TK
1	6,92	19,06
2	7,10	19,10
3	7,08	18,91

La méthode de FUCHS est beaucoup plus longue que celle de WIEST. Cependant elle donne une coloration beaucoup plus stable. Nous estimons toutefois préférable d'utiliser l'acide glycyrrhizique pur ou le sel monoammoniacal pur, que l'on hydrolyse dans les mêmes conditions que la prise d'essai, pour constituer la gamme-étalon.

Ces remarques étant faites, nous pensons que ces deux méthodes sont les seules à notre connaissance, à doser spécifiquement l'acide glycyrrhizique.

D - Méthode spectrophotométrique

L'acide glycyrrhétinique présente un spectre d'absorption dans l'ultraviolet (voir Chapitre III) ayant un maximum à 249 mμ. On peut mettre à profit ce caractère pour doser l'acide glycyrrhizique après hydrolyse.

Technique

Les conditions d'extraction, d'hydrolyse de l'acide glycyrrhizique sont exactement les mêmes que dans la méthode Wiest. L'acide glycyrrhétinique extrait par le chloroforme, lavé, desséché, est repris par l'alcool éthylique à 95° (exempt d'aldéhyde) puis examiné au spectrophotomètre U.V. Le témoin est constitué par un échantillon d'acide glycyrrhétinique pur.

Résultats : (mêmes échantillons).

Tableau VI

Dosage par la méthode spectrophotométrique

Essai	Glycyrrhizine (g. pour 100 g de)	
	Racine	Suc TK
1	7,01	19,18
2	7,18	19,09
3	7,22	19,56

IV - CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Le tableau suivant réunit tous les résultats obtenus par l'application des méthodes décrites.

Tableau VII

Résultat des analyses effectuées par différentes méthodes.

Méthode	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart
	1 - glycyrrhizine g/100 g. de racine				
Houseman	10,12	9,73	9,90	9,91	± 0,08
Fuchs	7,82	7,79	7,79	7,80	± 0,02
Wiest	6,92	7,10	7,08	7,03	± 0,07
Spectro.	7,01	7,18	7,22	7,14	± 0,09
	2 - glycyrrhizine g/100 g. de suc.				
Codex	34,35	26,61	45,27	35,41	± 9,86
Houseman	23,93	24,05	24,12	24,03	± 0,10
Fuchs	20,98	21,73	21,06	21,26	± 0,37
Wiest	19,06	19,10	18,91	19,02	± 0,08
Spectro.	19,18	19,09	19,56	19,28	± 0,19

De l'examen de ce tableau il ressort que :

1) La méthode du Codex donne des résultats présentant des écarts trop grands.

2) La méthode de Houseman ne dose pas spécifiquement l'acide glycyrrhizique. Elle est cependant fidèle et ne nécessite qu'un minimum de matériel.

3) La méthode de Fuchs donne des écarts plus élevés dans le suc. Ceci est dû probablement à la présence des acides uroniques libres dans le suc.

CHAPITRE II

EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ACIDE GLYCYRRHIZIQUE

I - PRINCIPE

L'acide glycyrrhizique se trouve dans la plante sous forme de sel de calcium et de potassium et non à l'état libre. Bien que les recherches soient dirigées d'une manière intense et depuis très longtemps en vue de l'obtention de cette substance à l'état pur, les résultats sont en général décevants. Ceci expliquerait pourquoi la nature chimique de l'acide glycyrrhizique n'a pas été élucidée complètement. Dans le cadre de nos recherches, nous nous proposons, avant tout, d'isoler le produit pur.

La matière première qui est venue automatiquement à l'esprit était évidemment la glycyrrhizine ammoniacale qui est facile à se procurer dans le commerce. Néanmoins, au cours de nos expériences nous nous sommes aperçu que la glycyrrhizine commerciale ne se prête pas avantageusement à la préparation car la proportion des impuretés est grande et par conséquent, le rendement est mauvais.

Il nous faut au préalable purifier ce produit commercial, ce qui demande une manipulation supplémentaire. Nous nous sommes adressé finalement à la racine de réglisse. Nous avons procédé à l'extraction en nous adressant aux méthodes décrites dans la littérature. Au cours de nos expériences, il nous est permis de constater certains avantages et certains inconvénients de ces procédés.

Après une brève discussion nous étudierons les principaux points qui nous permettent d'élaborer une méthode qui convient mieux à nos besoins et à nos possibilités d'étude.

II - GLYCYRRHIZINE AMMONIACALE

Sous le nom de glycyrrhizate d'ammoniaque ou glyzine, le Codex de 1884 désigne un produit présenté sous forme d'écailles brun-rougeâtres, translucides, inodores et de saveur sucrée. Assez soluble dans l'eau, sa solution colorée en jaune mousse par agitation.

A - Préparation

La littérature signale assez souvent le procédé d'obtention d'un produit

dénommé glycyrrhizine commerciale mais aucun ouvrage ne fixe les normes de ce procédé.

1) Méthode de ROUSSIN (51)

ROUSSIN fut le premier en 1875 à avoir décrit une méthode d'extraction de la glycyrrhizine ammoniacale.

"On fait un choix d'une racine de réglisse aussi sucrée et aussi bien conservée que possible ; on élimine tous les morceaux à cassure terne, et on ne traite que ceux qui présentent une cassure jaune et homogène. Ces morceaux, préalablement raclés superficiellement, sont fortement contusés de manière à les réduire en une sorte d'étoupe filandreuse ; cette matière mise à macérer à froid, pendant quelques heures avec le double de son poids d'eau distillée, est soumise à l'expression et traitée une seconde fois de la même manière. Les deux liqueurs sont réunies et abandonnées au repos, durant quelque temps dans un vase qui permette le dépôt de la fécule. Le liquide surnageant est porté à l'ébulliton, et filtré ensuite pour séparer les albumines coagulées. Lorsque les liqueurs filtrées sont refroidies, on y verse peu à peu en agitant vivement de l'acide sulfurique étendu d'eau jusqu'à cessation de tout précipité. Ce précipité d'abord gélatineux et floconneux, prend au bout d'un certain temps une cohésion et forme au fond du vase une masse compacte demi-molle. On rejette tout le liquide surnageant et après avoir grossièrement et à plusieurs reprises lavé ce dépôt avec de l'eau pure, on finit par le pétrir dans l'eau distillée qu'on renouvelle plusieurs fois, jusqu'à ce que toute acidité ait sensiblement disparu. La masse, bien lavée, et égouttée autant que possible est introduite dans un flacon avec environ trois fois son poids d'alcool à 90°. Après quelque temps d'agitation, tout étant dissous on ajoute au liquide sirupeux une nouvelle dose égale à la première d'alcool à 96° ou 98°. Il se précipite ainsi un peu d'acide pectique que l'on sépare par le filtre. Les liqueurs alcooliques sont additionnées d'éther ordinaire, jusqu'à cessation de tout précipité et abandonnées au repos durant 24 ou 48 heures. Au bout de ce temps, il se dépose une matière étrangère noirâtre et poisseuse qui adhère au flacon et permet la décantation du liquide surnageant. Ce liquide devenu limpide transvasé dans un autre récipient, est additionné peu à peu d'alcool à 90° très chargé de gaz ammoniac. Chaque goutte d'alcool ammoniacal détermine dans la liqueur la formation d'un précipité floconneux assez pesant, de couleur jaune, formé de glycyrrhizate d'ammoniaque. On s'arrête lorsque l'addition d'une nouvelle quantité d'alcool ammoniacal ne détermine plus aucun trouble. Le précipité est jeté sur une toile serrée, rapidement lavé avec un mélange à parties égales d'alcool et d'éther pour chasser la plus grande partie du liquide interposé, puis mis à sécher, soit dans un courant d'air chaud, soit sous une cloche au-dessus d'une couche d'acide sulfurique concentré."

"Desséchée la matière ainsi obtenue est d'une teinte jaunâtre clair, légère, entièrement et très rapidement soluble dans l'eau, à laquelle elle communique une couleur ambrée et une saveur absolument sucrée".

2) Méthode du CODEX 1884

"On broie un kilogramme de racines de réglisse (celles de Russie ou de Smyrne donnent un produit moins coloré). On les fait macérer pendant 4 heures, à deux reprises avec deux kilogrammes d'eau. Les liqueurs sont portées à l'ébulliton pour coaguler les matières albuminoïdes, on les filtre et on les additionne, après refroidissement environ de 20 g. d'acide sulfu-

rique dilué dans 80 g. d'eau. L'acide glycyrrhizique précipite et se rassemble peu à peu. On sépare alors le liquide surnageant et on malaxe le résidu à plusieurs reprises avec de l'eau distillée jusqu'à disparition de l'acidité. On le dissout dans le minimum d'ammoniaque officinal (15 ml) étendu de son poids d'eau ; on l'étale en couches minces sur des assiettes et on fait sécher à l'étuve à la température de 40°C".

3) Méthode de BERTOLO (5)

D'après cet auteur, la glycyrrhizine commerciale n'est pas un produit chimiquement homogène. Elle est composée plutôt d'un mélange de glycyrrhizinate d'ammonium neutre, d'un "bitter" glycyrrhizinique de formule $C_{36}H_{57}NO_{13}$, substance amorphe presque insoluble dans l'eau, contenant de l'azote et aussi des produits foncés solubles en réaction alcaline dans l'alcool. La proportion relative de ces différents éléments dépend de la méthode de préparation employée. L'auteur, après des recherches sur plusieurs sortes de glycyrrhizine commerciale donne le mode de préparation suivant :

"Les racines de réglisse sont épuisées à l'eau distillée à l'ébullition. L'extrait liquide est concentré à 12° Baumé. L'acide glycyrrhizique est précipité à froid par ajout de 20 g. d'acide chlorhydrique (D = 1,19) par litre d'extrait liquide, cet acide étendu de 2 fois son volume d'eau. On laisse le précipité reposer pendant toute la nuit, on le décante, on l'essore et on le lave à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage ait une réaction neutre. On dissout le précipité dans 30 cm^3 d'ammoniaque à 30 %, on concentre la solution jusqu'à consistance pâteuse, on ajoute l'alcool contenant de l'ammoniaque, enfin on sèche sans dépasser 80°. Pour séparer la "glycyrrhizine azotée" amorphe, BERTOLO préconise l'emploi de sel de cadmium".

"On obtient le sel de cadmium en ajoutant à une solution aqueuse de glycyrrhizine une solution aqueuse de chlorure de cadmium. Il se précipite à chaud une masse molle, qui à froid, devient dure et friable. On lave à plusieurs reprises à l'eau bouillante, la reliquat est repris dans de l'alcool de vin, et soumis à un courant de SH2. L'acide glycyrrhizique passe en solution alcoolique, il peut être repris par évaporation ou par cristallisation à plusieurs reprises par l'acide acétique".

4) Discussion sur les méthodes

Nous avons essayé de préparer la glycyrrhizine ammoniacale par l'application des méthodes décrites ci-dessus. Les substances obtenues sont soumises à l'analyse afin de déterminer le degré de pureté, en comparaison avec quelques échantillons de glycyrrhizine commerciale. Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-dessous (Tableau VIII).

Il est toutefois nécessaire que nous rapportions les remarques suivantes :

a) La méthode du Codex de 1884 est de, loin d'une application aisée, et c'est sans doute celle qu'on utilise couramment dans l'industrie de réglisse. Cependant elle donne une substance présentant des caractéristiques variables. D'autre part elle ne représente pas le sel ammoniacal de l'acide glycyrrhizique pur et sa solubilité dans l'eau n'est pas totale.

b) La méthode de ROUSSIN, qui a le mérite d'être la première à avoir été décrite, donne des résultats analytiques plus constants. La réalisation en est, par contre, très fastidieuse.

c) Quant à la méthode de BERTOLO, elle peut être utilisée pour les réalisations industrielles, car elle donne de belles écailles noires brillantes ; le rendement y est très supérieur à ceux obtenus par d'autres procédés. Néanmoins le produit n'est pas parfaitement soluble dans l'eau.

Nous avons essayé d'autre part, la séparation de la glycyrrhizine pure en passant par le sel de cadmium, comme l'a préconisé BERTOLO, nous avons effectivement obtenu un produit plus pur que celui de ROUSSIN, mais le rendement est très bas.

Tableau VIII

Dosage de l'acide glycyrrhizique sur divers échantillons de glycyrrhizine ammoniacale

Glycyrrhizine ammoniacale obtenue par la méthode de	Acide glycyrrhizique (en g. p. 100)		
	Dosage par la méthode de		
	HOUSEMAN	FUCHS	WIEST
Commerciales :			
Echantillon Z. 1	56,3	32,6	30,8
Echantillon Z. 2	54,2	31,5	30,6
Echantillon G.	55,6	32,0	30,6
ROUSSIN	67,2	40,6	39,5
BERTOLO	67,8	41,5	40,0
Codex 1884	52,1	29,6	28,8

B - Méthode proposée

Les résultats rassemblés dans le tableau ci-dessus nous permettent de conclure qu'aucune méthode de préparation de glycyrrhizine appliquée précédemment ne donne un produit analytiquement constant et pur.

Au cours de nos recherches en vue de l'obtention d'un produit standard, nous sommes amenés à envisager deux étapes successives, la première nous conduit à une glycyrrhizine purifiée, c'est-à-dire débarrassée des matières albuminoïdes et glucidiques mais contenant toutefois une matière colorée ; la seconde nous donnera une glycyrrhizine légèrement teintée et analytiquement pure.

a) Obtention d'une glycyrrhizine ammoniacale purifiée

Le principe général de cette préparation consiste à obtenir :

- une liqueur d'extraction de la racine de réglisse par macération ou ébulliton dans de l'eau,

- un précipité à partir du jus d'extraction par addition d'un acide minéral fort.

- une neutralisation de ce précipité, après lavage, par de l'ammoniaque,

- des écailles brillantes par séchage de la liqueur ammoniacale en l'étalant sur des plaques ou dans des assiettes.

Aussi simple que cela puisse paraître, cette préparation, pour être menée à bien, exige quelques précautions.

Premier temps : obtention d'un extrait aqueux

Nous avons utilisé pour cette opération, l'appareil classique type Soxhlet. La racine de réglisse est broyée au moyen d'un petit broyeur de laboratoire. On obtient ainsi des petits copeaux. On charge 500 g de bois broyé dans la cartouche, puis on introduit 2 litres d'eau distillée. L'extraction dure 8 heures.

Au bout de ce temps, la liqueur d'extraction chaude est transvasée dans un bécher de 5 litres en pyrex. On laisse le sirop refroidir. Après refroidissement on filtre pour séparer les matières albuminoïdes et glucidiques.

Deuxième temps : précipitation de l'acide glycyrrhizique brut par un acide minéral fort

a) Choix de l'acide : l'acide nitrique étant d'une utilisation peu commode, nous avons essayé de précipiter avec l'acide sulfurique et l'acide chlorhydrique. Contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature, la nature de l'acide n'a aucune influence sur le résultat. Il est toutefois nécessaire que l'acide utilisé soit dilué légèrement.

b) Influence de la température : la température constitue un facteur important dans cette opération. En effet, pour que la précipitation soit totale, il est nécessaire de respecter une température déterminée. Cette température a été étudiée par tâtonnement dans une série d'expériences que nous décrirons ultérieurement. D'autre part, une température élevée risque de favoriser une hydrolyse partielle de l'acide glycyrrhizique par action de l'acide sulfurique ou de l'acide chlorhydrique.

Détermination de la température :

Dans une série de béchers d'une capacité de 250 ml on introduit 100 ml d'un extrait aqueux concentré à 12°B. de réglisse. On les refroidit à des températures de +4°, +6°, +8°, +10°, +12°, +14°, +18°, +20°C. On ajoute à chaque solution 10 ml d'acide sulfurique dilué au quart. Il se forme un précipité floconneux. On laisse reposer 30 minutes puis on centrifuge pour recueillir le précipité. On le lave deux fois à l'eau distillée et on le dissout dans 10 ml d'ammoniaque diluée au 1/4. On recueille la liqueur ammoniacale dans une cupule tarée. On évapore au bain-marie, on finit le séchage à l'étuve à 100° puis on pèse.

La courbe ci-dessous représente la variation du poids du précipité sec en fonction de la température à laquelle on fait la précipitation.

c) Influence de la concentration de l'extrait aqueux : pratiquement, on fait la précipitation sur l'extrait filtré ; la concentration de cette dernière n'a aucune influence sur la quantité et la qualité du précipité.

Ces conditions étant définies, nous avons précipité l'acide glycyrrhizique de la manière suivante :

L'extrait aqueux filtré est mis à refroidir au réfrigérateur ou dans un bain de glace jusqu'à la température de 7°-8°C. On verse en agitant régulièrement, de l'acide sulfurique dilué au 1/4 jusqu'à ce que la précipitation soit totale, c'est-à-dire qu'un excès d'acide ne précipite plus la liqueur surna-

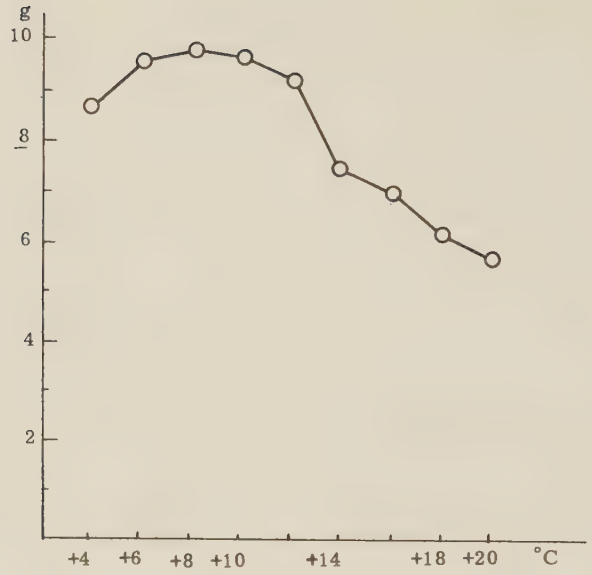


Fig.1 - Variation du poids du précipité en fonction de la température de précipitation.

geante. On laisse reposer au réfrigérateur pendant 30 minutes puis on décante pour séparer le précipité qu'on lave plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à réaction neutre.

Troisième temps : Transformation en sel d'ammonium

On dissout le précipité lavé avec 10 ml d'ammoniaque dilué au 1/4. On porte le tout au bain-marie à la température de 50°C, en agitant régulièrement. Il se forme assez rapidement un liquide visqueux brun. On continue à chauffer pour chasser l'excès d'ammoniaque, puis on coule sur des plaques en verre. Le séchage se fait à l'air libre. Quand la glycyrrhizine ammoniacale est séchée, il se forme des écailles brillantes qui se détachent de la plaque de verre. La récolte se fait sans difficulté.

Le produit obtenu est soluble dans l'eau froide donnant une solution limpide et jaune foncée. L'analyse effectuée en appliquant la méthode de HOUSEMAN donne un degré de pureté de 90 % ; par contre si on utilise la méthode de WIEST ou de FUCHS, on trouve un degré de pureté de 62 à 65 %.

Le rendement de l'opération est de 7 à 10 % selon la provenance de la matière première.

b) Préparation de l'acide glycyrrhizique pur

Les caractères de solubilité de l'acide glycyrrhizique relevés dans la littérature sont les suivants :

Soluble dans : eau bouillante ; alcool étendu ; vinaigre glacial chaud ; acétone hydratée dioxane aqueux.

Insoluble dans : eau froide ; éther sulfurique ; chloroforme.

Nous avons essayé de séparer l'acide glycyrrhizique à l'état pur en nous basant sur ces caractères de solubilité. En fait, les résultats obtenus sont catastrophiques, l'acide glycyrrhizique ne s'est formé en aucun cas en un produit cristallisé. Il s'est formé tout au plus un produit très légèrement floconneux dont la séparation par centrifugation nous conduit à une masse de gel qui noircit en séchant même sous vide sur une substance desséchante.

Il semble qu'il soit impossible par cette voie d'obtenir la substance pure. Ce fait a été remarqué par nos prédécesseurs, notamment VOSS (72), RINGEL (52), qui sont obligés de passer par un stade intermédiaire : l'obtention d'un sel mono-ammoniacal de l'acide glycyrrhizique dont l'isolement a été décrit pour la première fois par HABERMANN (23).

Sels mono-alcalins de l'acide glycyrrhizique

Selon l'hypothèse de RINGEL (52), il y a une nette différence entre les comportements des groupements carboxyliques de l'acide glycyrrhizique. L'auteur, au cours de ses expériences, a constaté que les sels monoalcalins sont remarquables par leur aptitude à la cristallisation et que cette propriété est vraisemblablement due au groupement carboxylique de l'aglucone. D'autre part, il est facile d'obtenir ces sels monoalcalins par cristallisation dans l'acide acétique dont la faible acidité n'est pas suffisante pour déplacer le dernier groupement alcalin, ce dernier étant facilement déplacé par l'utilisation d'un acide minéral fort.

Nous reviendrons ultérieurement sur les possibilités d'étude et d'interprétation sur le mode de réactions de ces sels, nous nous contentons de décrire ici, simplement, le procédé d'obtention des sels mono-ammoniacal, sodique et potassique de l'acide glycyrrhizique et partant de là les possibilités d'obtention de l'acide glycyrrhizique pur.

1) Sel mono-ammoniacal

Dans un ballon muni d'un agitateur et surmonté d'un réfrigérant à reflux, on dissout 200 g de glycyrrhizine ammoniacale purifiée dans 600 ml d'acide acétique glacial bouillant. On transvase la solution noirâtre visqueuse, dans un bécher d'un litre qu'on laisse refroidir lentement à l'air libre. Quand la solution est suffisamment froide, on laisse séjourner dans la glacière pendant 2 jours pour que la cristallisation se fasse bien. On sépare les cristaux par centrifugation. On les lave deux fois avec l'acide acétique. On obtient après cette opération les cristaux jaunâtres qui retiennent fortement l'acide acétique. Pour éliminer cet acide, on lave deux fois avec un mélange à parties égales d'alcool éthylique et d'éther sulfurique.

Après séchage, on achève l'élimination de l'acide acétique par lavage à l'éther sulfurique. Cette opération se fait très correctement au Soxhlet, dans le ballon duquel on introduit quelques copeaux de sodium pour fixer l'acide. On obtient alors après séchage une substance en fins cristaux jaune clair.

Rendement : 49 g. soit 24,5 % du produit initial.

La purification de ce sel se fait par recristallisation dans l'alcool éthylique. Les cristaux formés sont groupés sur la paroi du bécher et dans le fond de celui-ci, en amas rappelant la forme d'un oursin. On recueille le produit par filtration sur buchner, on le lave à l'alcool puis à l'éther. Le séchage peut se faire à l'air libre ou sous vide sur du chlorure de calcium.

Rendement : 30 g. soit 15 % du produit initial.

Caractères

Le glycyrrhizate mono-ammoniacal ainsi obtenu se présente sous forme de fines paillettes brillantes de couleur très légèrement crème.

Il est insoluble dans l'alcool absolu, soluble dans l'alcool à 50°, donnant avec l'eau un gel.

Analyse du sel obtenu

La substance quelque peu hygroscopique a été séchée sous vide sur de l'anhydride phosphorique jusqu'à poids constant.

a) Dosage de l'azote : ce dosage se fait par la méthode classique de distillation alcaline. Nous avons utilisé l'appareil du type Schloesling et Aubin.
1er dosage : 1,250 g consomme 14,65 ml de NaOH 0,1 N
2me dosage : 1,127 g consomme 12,70 ml de NaOH 0,1 N
Taux de l'azote trouvé sur l'ensemble des deux dosages : 1,61 %
Formule brute (VOSS, 76) : $C_{42}H_{65}O_{16}N$ = 839,52
Taux de l'azote théorique : 1,67 %

b) Dosage alcalimétrique : le sel est dissous à chaud dans un excès de soude 0,1 N titrée. On titre cet excès par une solution d'acide sulfurique 0,1 N en présence de la phénolphtaléine.
1er dosage : 0,285 g consomme 9,15 ml de NaOH 0,1 N
2me dosage : 0,192 g consomme 6,85 ml de NaOH 0,1 N
Poids moléculaire calculé sur l'ensemble des deux dosages : 843.

c) Pouvoir rotatoire : nous avons utilisé l'appareil de JOBIN et YVON.

Solvant : alcool éthylique à 50 %
Longueur du tube : 5 dm
Concentration : 2,30 g/100 ml

α 1 = + 5° 1
α 2 = + 5° 1
α 3 = + 5° 0

$[\alpha]_D^{19}$ = + 44° 1

2) Sels mono-potassique et mono-sodique

Ces sels sont préparés de la même manière que le sel mono-ammoniacal. Il suffit de remplacer l'ammoniaque dans le troisième temps de préparation de la glycyrrhizine purifiée par la potasse ou la soude.
Caractères : les cristaux obtenus sont légèrement plus jaunes que le sel mono-ammoniacal. Les caractères de solubilité sont les mêmes que ce dernier.

Analyses

Dosage du sodium et du potassium. - Nous avons utilisé le procédé de dosage par le spectrophotomètre de flamme.

Taux de K = 4,30 % (théorie = 4,53 %)
Taux de Na = 2,70 % (théorie = 2,72 %)

III - ACIDE GLYCYRRHIZIQUE

A - Acide glycyrrhizique à partir des sels mono-alcalins

Nous avons repris la méthode décrite par VOSS (76). A notre grande surprise, il nous a été impossible d'isoler l'acide glycyrrhizique tel que l'auteur l'a décrit.

"On fait une bouillie épaisse en triturant 20 g de glycyrrhizate mono-ammoniacal ou mono-potassique ou mono-sodique, dans un peu d'eau distillée. On fait chauffer au bain-marie 1,5 l d'acide sulfurique à 1 %.On ajoute le sel dans l'acide en agitant continuellement. Après 10 minutes de chauffage, on obtient une solution simpide. Après chauffage d'une heure au bain-marie, l'acide glycyrrhizique commence à se séparer en cristaux blancs fins soyeux. On les retire, les lave à l'eau distillée. Il en était obtenu 16 g.".

Nous avons pu observer, quant à nous, la formation au bout d'une heure de chauffage au bain-marie, d'un trouble au fond du ballon ayant l'apparence d'une suspension très fine. Il nous a été impossible de recueillir le précipité.

Avant nous, RINGEL (52) a signalé la différence de comportement entre les sels monoalcalins et les sels alcalins saturés. L'auteur a constaté "qu'un traitement à l'alcali des sels difficilement décomposables est capable de les transformer en sels facilement décomposables". Ce chercheur a, en outre, constaté que, s'il est facile d'obtenir un sel *tripotassique*, on ne peut, par contre, obtenir seulement un sel *di-ammoniacal*. L'auteur a conclu que les trois groupements carboxyle de l'acide glycyrrhizique se différencient nettement par leur basicité. En solution potasso-alcoolique, les trois groupements acide réagissent alors qu'en milieu ammoniacal deux seulement réagissent. Nous avons repris dans les grandes lignes les méthodes utilisées par RINGEL. Les résultats d'analyse confirment les données de cet auteur.

B - Sel di-ammoniacal d'acide glycyrrhizique

On dissout 10 g de glycyrrhizate mono-ammoniacal dans 50 ml d'un mélange alcool éthylique - eau (2-1). On ajoute 8 ml d'ammoniaque à 25 %. La solution est totale et fortement colorée en jaune. On maintient à 37°C pendant 24 heures dans un flacon bien fermé. Après refroidissement, on verse la solution goutte à goutte *en bien remuant* dans 200 ml d'alcool absolu. Il se forme un précipité crémeux. On laisse reposer une nuit pour que la précipitation soit totale. On filtre pour recueillir la substance sur un buchner, on lave à l'alcool absolu puis on sèche sur du chlorure de calcium, sous vide.

Rendement = 9,2 g.

Caractères

Poudre amorphe très légèrement teintée en jaune très soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool absolu, l'éther sulfurique.

Analyse du sel obtenu.

a) taux de l'azote :

1er dosage N % : 3,12 %
2me dosage N % : 3,17 %

Ce taux de l'azote indique bien qu'il s'agit d'un sel di-ammoniacal ayant la formule :

$C_{42}H_{68}O_{16}N_2$ = 856,42
N % théorique = 3,27 %

b) titrage par la soude. Le sel est dissous à chaud dans un excès de soude 0,1 N qu'on titre par une solution d'acide sulfurique 0,1 N.

1er dosage = 0,287 g consomme 10,3 ml NaOH 0,1 N
2me dosage = 0,178 g consomme 6,2 ml NaOH 0,1 N
Poids moléculaire trouvé = 848

c) Pouvoir rotatoire :

$[\alpha]_D^{20}$ = + 43°5 (solvant = eau)

C - Sel tri-potassique d'acide glycyrrhizique

On dissout 10 g de glycyrrhizate mono-ammoniacal dans 50 ml d'un mélange alcool - eau (2-1). Après ajout de 2,5 g de potasse en pastilles, on porte la solution au bain-marie bouillant pendant 4 heures.

On refroidit la solution alcoolique puis on la verse dans 200 ml d'alcool absolu, en agitant continuellement. Il se forme un précipité jaune clair qu'on laisse déposer toute la nuit. On recueille le précipité, le lave à l'alcool absolu et le sèche sous vide sur du chlorure de calcium.

Rendement = 10,90 g.

D - Sel trisodique de l'acide glycyrrhizique

Ce sel se prépare de la même manière que le sel tripotassique.

Rendement = 10,20 g.

Caractères

Les sels alcalins obtenus se présentent sous forme d'une poudre amorphe jaune clair, très soluble dans l'eau, donnant avec celle-ci une solution jaune fluorescente. Insoluble dans l'alcool absolu, l'éther sulfurique.

La saveur est très douce.

Pour l'analyse de ces deux sels, nous nous contentons de doser le potassium et le sodium et mesurer le pouvoir rotatoire, notre seul but étant de vérifier qu'il s'agit d'un sel di- ou tri-potassique ou sodique.

Pouvoir rotatoire :

Sel de potassium $[\alpha]_D^{20}$ = + 44°5

Sel de sodium $[\alpha]_D^{20}$ = + 45°

Taux de K = 11,9 % (théorie 12,5 %)
Taux de Na = 7,82% (théorie 7,77 %)

E - Acide glycyrrhizique à partir des sels alcalins saturés

a) à partir du sel di-ammoniacal

La méthode utilisée est celle décrite plus haut. Ici encore il nous a été impossible d'obtenir l'acide glycyrrhizique à l'état cristallisé.

b) à partir du sel tripotassique

L'isolement de l'acide glycyrrhizique à partir de ce sel est facile. Sur 10 g. de glycyrrhizate de potassium mise en réaction nous avons obtenu 7,2 g. l'acide glycyrrhizique.

c) à partir du sel trisodique

Le résultat est identique à celui obtenu par le sel tripotassique. Sur 10 g de glycyrrhizate de sodium on obtient 6,75 g.

1) Caractères

L'acide glycyrrhizique se présente sous forme de cristaux fins soyeux, blanc mat. Insoluble dans l'eau il donne avec l'eau tiède une suspension très fine, moyennement soluble dans l'eau chaude. Soluble dans l'alcool à 50 % il est insoluble dans le chloroforme.

Le produit obtenu contient quelques impuretés en l'occurence l'acide glycyrrhétinique provenant sans doute d'une hydrolyse partielle de l'acide glycyrrhizique.

En effet le pouvoir rotatoire $[\alpha]\frac{20}{D} = +67°5$, assez élevé par rapport aux sels alcalins, indique la présence d'une petite quantité d'aglucone.

Pour l'enlever nous avons extrait l'acide glycyrrhétinique par le chloroforme pendant 2 heures à l'aide d'un appareil de Soxhlet.

2) Essais de purification

En consultant la liste des solvants qui solubilisent l'acide glycyrrhizique (voir p. 42) on est tenté de mettre à profit ces caractères pour purifier la substance.

Malheureusement le résultat pratique ne répond pas du tout aux données théoriques. Le seul solvant avec lequel nous arrivions à faire une cristallisation est l'acide acétique (encore que le rendement est-il mauvais). Cependant, comme nous l'avons signalé à propos du sel mono-ammoniacal, cet acide adhère fortement au produit. Par conséquent il est nécessaire de l'éliminer par une extraction à l'éther sulfurique.

3) Analyse de l'acide glycyrrhizique

La substance soumise à l'analyse est desséchée sous vide sur de l'anhydride phosphorique.

a) Titrage par la soude

- Titrage direct : Une prise d'essai est dissoute dans l'alcool à 50 %. On titre l'acidité par une solution de soude 0,1 N en présence de phénolphtaléine.

Trois essais ont été effectués ; il nous a été impossible d'obtenir un virage franc. Devant cet inconvénient, nous avons procédé au titrage par retour.

- Titrage par retour : Une prise d'essai p exactement pesée est dissoute à chaud dans un excès de soude 0,1 N. On titre l'excès de soude par une solution d'acide sulfurique 0,1 N.

1er dosage = 0,289 g 10,5 ml NaOH 0,1 N

2me dosage = 0,142 g 5,15 ml NaOH 0,1 N
Poids moléculaire trouvé = 828
Théorie = $C_{42}H_{62}O_{16}$ = 822,5

b) Pouvoir rotatoire

$[\alpha]_D^{20}$ = + 57°
C = 2,763 g/100
1 = 2 dm
α 1. = + 3° 15
α 2. = + 3° 15
α 3. = + 3° 15.

IV - CONCLUSIONS DU CHAPITRE

Il ressort de ces études que :

1) L'acide glycyrrhizique est une substance optiquement active, cristallisée sous forme d'aiguilles soyeuses.

2) On peut l'isoler à l'état pur à partir de son sel tripotassique ou trisodique.

3) Il est possible d'obtenir les sels tripotassique ou trisodique mais il est impossible d'obtenir le sel tri-ammoniacal. Le sel saturé d'ammoniaque est un sel di-ammoniacal.

4) Malgré l'emploi de l'acide sulfurique très dilué (1 %) et du chauffage très doux, on ne peut pas éviter un début d'hydrolyse de la molécule. On doit éliminer l'aglucone formé par extraction au chloroforme.

Tableau IX

Caractéristiques de l'acide glycyrrhizique et de ses sels.

Substance	Poids moléculaire		N, Na ou K (en %)		Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20}$
	théorique	trouvé	théorique	trouvé	
Acide glycyrrhizique $C_{42}H_{62}O_{16}$	822,5	828			+ 57°
Glyc. Monoammoniacal $C_{42}H_{65}O_{16}N$	839,5	843	N = 1,67	N = 1,61	+ 44°1
Glyc. Diammoniacal $C_{42}H_{68}O_{16}N_2$	856,4	848	N = 3,27	N =3,145	+ 43°5
Glyc. Tripotassique $C_{42}H_{59}O_{16}K_3$	936,5	982	K = 12,5	K = 11,9	+ 44°5
Glyc. Trisodique $C_{42}H_{59}O_{16}Na_3$	888,5	882	Na = 7,77	Na= 7,82	+ 45°

CHAPITRE III

SUR LA CONSTITUTION DE L'ACIDE GLYCYRRHIZIQUE

I - GENERALITES

On sait que l'hydrolyse d'un hétéroside conduit à la formation d'un aglucone et de sucres dont les plus fréquents sont le glucose, le rhamnose, le galactose, le xylose et aussi des acides uroniques.

L'hydrolyse de l'acide glycyrrhizique donne, nous l'avons vu, l'acide glycyrrhétinique et la partie osidique, dont la nature chimique déjà étudiée par quelques auteurs, reste cependant vague.

Il convient, avant d'examiner les produits issus de l'hydrolyse, de décrire les conditions de celle-ci.

II - HYDROLYSE

Il ne peut être établi jusqu'ici d'une façon certaine, si les conditions particulières indiquées par chacun des auteurs pour l'hydrolyse de l'acide glycyrrhizique diffèrent les unes des autres par la qualité et la quantité des substances de dédoublement.

En outre, il est difficile d'adopter une méthode définitive d'hydrolyse pour l'étude simultanée des deux substances. On n'ignore pas que l'étude des acides uroniques est rendue malaisée par la grande stabilité des liaisons glucuronosidiques et par la labilité de ces corps dans les conditions brutales d'hydrolyse.

Il y a lieu, par conséquent, d'adapter chacune des méthodes aux conditions exigées par l'étude du constituant que l'on se propose d'étudier.

A - Hydrolyse acide

On utilise en général, soit l'acide sulfurique, soit l'acide chlorhydrique. Le chauffage se fait à l'air libre ou à l'autoclave.

Les deux procédés donnent tous deux un aglucone impur par suite des produits de décomposition. D'autre part les rendements sont identiques ainsi que les caractéristiques des hydrolysats.

Technique

Dans un ballon d'une capacité de 1000 ml, à col court à deux tubulures, on introduit 5 g d'acide glycyrrhizique pur, 500 ml d'une solution d'acide sulfurique à 3 %.

Par les deux tubulures on monte d'un côté un réfrigérant ascendant, de l'autre côté un thermomètre. Le col du ballon est surmonté d'un agitateur intérieur mécanique. Le ballon est placé dans un bain d'huile (T = 130°C). L'acide glycyrrhétinique, insoluble dans l'eau, se dépose au fur et à mesure de sa libération de l'acide glycyrrhizique. L'opération dure 4 heures.

On filtre pour isoler l'acide glycyrrhétinique qui constitue le résidu.

- Rendement en acide glycyrrhétinique brut : 2,7 g., soit 95 % de la quantité théorique.

On conserve le filtrat pour l'étude des sucres.

B - Alcoolyse

Les recherches de VOSS, WASCH et HEISIG (76) ont montré que la coupure de la liaison glucosidique se fait plus facilement par alcoolyse que par hydrolyse.

Technique

Chauffer 50 g de glycyrrhizate mono-ammoniacal avec 250 ml d'une solution d'alcool méthylique contenant 3% d'acide chlorhydrique, pendant 8 heures. Au bout de quelques heures de chauffage, on observe déjà l'apparition des cristaux blancs en aiguilles au fond du ballon.

Le glycyrrhétinate de méthyle essoré est recristallisé dans l'alcool éthylique.

- Rendement en glycyrrhétinate de méthyle : 25 g.

Nous avons, par cette méthode, essayé d'isoler d'une part, le glycyrrhétinate de méthyle en vue d'une transformation ultérieure en acide glycyrrhétinique, d'autre part, l'ester diméthylique d'acide uronique (RINGEL, 52). Malheureusement contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature, nous n'avons pas pu ni libérer complètement l'acide glycyrrhétinique de son éther, ni cristalliser l'ester diméthylique d'acide uronique.

C - Hydrolyse enzymatique

Cette méthode qui nous servira uniquement pour l'étude chromatographique des oses et à propos de laquelle nous reviendrons plus tard, est calquée sur celle décrite par JAYLE et Collaborateurs (29) concernant les composés glucurostéroïdes urinaires.

III - PARTIE OSIDIQUE

Nous avons eu l'occasion de rapporter les travaux de différents auteurs sur la constitution de la fraction osidique de l'acide glycyrrhizique. La remarquable étude analytique de RINGEL (52) sur les sels de baryum et de brucine ainsi que les dérivés méthylés de ces sucres donne des renseignements précieux, à savoir :

- qu'il s'agit des acides uroniques,
- qu'il n'y a pas de groupement aldéhydique libre,
- que ces acides uroniques ne sont pas des acides mannuroniques.

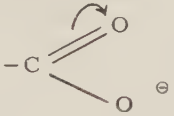
Malheureusement, nous ne savons pas encore d'une manière certaine la nature de ces acides. Il n'est pas douteux que l'étude des sucres rencontre des difficultés notables et demeure délicate.

Une méthode très féconde dans l'étude des oligosides en général consiste à effectuer une hydrolyse acide ou enzymatique de ces substances, puis à identifier par les méthodes chromatographiques appropriées les oses formés.

L'application de la chromatographie sur papier facilite dans la plupart des cas cette identification. Cependant, elle n'exclut pas l'utilisation des anciennes méthodes notamment dans la purification préalable des hydrolysats.

En outre, parmi les oligosides, les acides aldobio- et aldotrio-uroniques formés d'un reste d'acide uronique et d'un ou de deux restes d'aldose, d'une part, les acides polyuroniques de l'autre, ont la particularité d'avoir la solidité de leurs liaisons osidiques considérablement renforcée vis-à-vis de l'hydrolyse acide par la présence du groupement carboxyle en position 6 de l'acide uronique.

D'après J.K. HAMILTON, E.V. PARTLOW et D.S. THOMSON (28) ce renforcement de la solidité des liaisons osidiques s'expliquerait par la propriété d'accepteur d'électron du groupement carboxyle



Cet effet se transmettrait à la liaison osidique par l'oxygène du cycle pyranose.

Il en résulte qu'une hydrolyse de quelques heures à 100°C par un acide minéral dilué (N ou N/2) suffisante pour rompre la plupart des liaisons osidiques se montre insuffisante pour rompre les liaisons qui relient les acides uroniques ou aldo-uroniques, même en prolongeant le temps d'hydrolyse et en opérant en tube scellé.

Cette difficulté achève de compliquer le problème.

Ce serait faire preuve d'un optimisme exagéré que de prétendre, par le seul examen chromatographique, identifier d'une façon certaine les sucres en général, et les fractions osidiques de l'acide glycyrrhizique en particulier.

Compte tenu des travaux décrits jusqu'ici, travaux que nous avons examinés rapidement dans la revue bibliographique et qui portent sur les études purement chimiques, nous décrirons dans ce chapitre, nos recherches chromatographiques afin d'essayer d'apporter quelque contribution à l'identification de ces acides uroniques.

A - Purification préalable de l'hydrolysat

L'étude des oses par chromatographie sur papier n'est possible qu'après une purification préalable des solutions à étudier. La présence des ions minéraux en particulier, provoque des "trainés" et rend impossible la lecture des chromatogrammes. Il en est de même pour quelques anions comme l'anion SO_4^{--}.

a) Hydrolyse sulfurique

L'hydrolysat obtenu par l'hydrolyse sulfurique décrite plus haut est recueilli par filtration pour séparer l'acide glycyrrhétinique (pour les commodités d'étude ultérieure, appelons ce filtrat : "S.OSI. INITIALE").

On neutralise par une solution saturée de baryte qui précipite les ions SO_4^{--}. On filtre la solution claire qui contient les acides uroniques et un excès de baryte que l'on élimine en faisant passer un courant de gaz carbonique qui précipite le baryum sous forme de carbonate de baryum. Après une nouvelle filtration, il ne reste dans la solution que les uronates de baryum (certains auteurs ont procédé à la neutralisation de l'hydrolysat acide par un lait chaud de carbonate de baryum. Si cette méthode est utile pour décomposer les lactones accidentellement formées au cours de l'expérience, elle favorise par contre, la production d'un artéfact : l'épimérisation (A. ROUDIER et L. EBERHARD, 50).

La déminéralisation se fait alors par passage sur une colonne de résine à échangeuse de cations : Amberlite IR - 100 (H^+). Les acides uroniques déminéralisées sont réduits à petit volume par distillation sous vide. Nous les appelons : "S. OSI. INIT. PURE".

b) Hydrolyse enzymatique

En raison de la spécificité des réactions d'hydrolyses enzymatiques, on peut penser identifier grossièrement les acides uroniques en utilisant un enzyme du type uronidase. Nous avons essayé, quant à nous, l'hydrolyse par la β-glucuronidase en empruntant la méthode de JAYLE.

L'enzyme à notre disposition est contenu dans le suc digestif d'Helix prometia (de l'Industrie biologique française).

L'acide glycyrrhizique (10 mg) est dissous dans un mélange tampon acéto-acétique, pH 5,2 exactement ajusté. On y ajoute 700 unités de glucuronidase. On met à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. On peut observer au bout de ce temps un dépôt grisâtre d'acide glycyrrhétinique. Après filtration, la solution d'acide uronique est absorbée sur une colonne de résine échangeuse d'anion : Amberlite IR-4B (OH^-) (forme acétate). L'élution est effectuée à l'aide de l'acide acétique N. L'éluat est concentré sous vide. ENZ.1.

Une hydrolyse enzymatique effectuée dans les mêmes conditions sur la "S.OSI.INIT. PURE" donne un produit d'hydrolyse portant le nom ENZ.2.

B - Technique chromatographique

1) Matériel

Le papier utilisé est du Whatman n° 1.

- Système de solvant :

Etant donné que nous avons limité nos études à la chromatographie des acides uroniques et éventuellement des monoses, nous avons adopté deux systèmes de solvant qui nous semblent les plus pratiques :

Système n° 1 (PALDINI et LENOIR)

Acétate d'ammonium 1 M pH 7,5	3 vol
Ethanol 95°	7,5 vol

Système n° 2

Acétate d'étyle	9 vol
Acide acétique	1,5
Acide formique	0,5
Eau	2

- Réactifs révélateurs :

a) Naphtorésorcinol :

Naphtorésorcinol	0,2 % dans l'acétone	5 vol
Acide phosphorique	9 % dans l'eau	1 vol

Le papier est trempé dans la solution et mis à sécher à 95°C. Au bout de quelques minutes les cétoses pentoses sont colorés en vert brun, puis les cétoses en rouge brun 5 à 8 minutes plus tard, les acides uroniques apparaissent en bleu ; les aldoses sont sans réaction.

b) Aniline diphénylamine :

Aniline 1 % (1ml) plus diphénylamine 1 % dans l'acétone	10 vol
Acide phosphorique 85 %	1 vol

Le papier trempé dans la solution est séché à 95°. En raison de la présence de l'acide phosphorique concentré il faut veiller à ce que le papier ne soit pas détérioré. Pour cela on place le chromatogramme dans une étuve portant une porte vitrée, réglée à 95°C, puis on regarde l'apparition des taches. Les oses apparaissent en vert, brun ou bleu selon s'il s'agit du xylose, des acides uroniques ou des monoses comme le glucose ou le galactose.

- Valeurs de R_g ou R_x. - En raison de la lente migration des oses dans ces systèmes de solvant, et le rapide écoulement de ces solvants, il est presqu'impossible d'évaluer les taches par le calcul du Rf classique : au bout de 6 heures de migration le papier est complètement imprégné. On choisit donc les valeurs arbitraires calculées en comparaison avec la distance de migration, soit du xylose, soit du glucose, selon la formule :

$$R_g = \frac{\text{distance de migration de la substance étudiée} \times 100}{\text{distance de migration du glucose}}$$

$$R_x = \frac{\text{distance de migration de la substance étudiée} \times 100}{\text{distance de migration du xylose}}$$

Substances de référence :

- glucose
- galactose
- xylose
- D-glucurone
- Acide galacturonique
- Acide glucuronique

C - Résultats et Discussion

1) Fraction osidique provenant des hydrolyses acides

S. Osi. Hydr. I : Hydrolyse tube scellé, HCl N
18 heures à 100°C.

S. Osi. Hydr. II : Hydrolyse tube scellé, HC1 N
24 heures à 100°C.

(Chromatogrammes représentés par les figures 2 et 3).

Avec le système de solvant n° 1, on arrive à différencier l'acide galacturonique de l'acide glucuronique. Par contre la glucurone est décomposée.

Nous remarquerons que la substance n'est pas complètement hydrolysée par voie chimique, même en opérant en tube scellé et en prolongeant le temps de réaction.

Avec le système de solvant n° 2, la glucurone est intacte et migre très loin.

Valeurs des Rx :

Acide galacturonique	: 48,3		
Acide glucuronique	: 57,1		
S.osi.initiale	: 25		
S.osi.hydr. I	:	A = 25,6	B = 57,5
S.osi.hydr.II	:	A = 25,6	B = 58

De l'examen de ces deux chromatogrammes, nous pouvons noter que :

- la présence de l'acide glucuronique est effective dans la partie osidique,

- l'hypothèse de la présence d'acide galacturonique est peu probable.

- il est quasi-impossible par l'hydrolyse chimique d'obtenir la coupure de la liaison osidique.

2) Fraction osidique provenant de l'hydrolyse enzymatique :

Chromatogramme reproduit sur la figure n° 4 :

ENZ. 1
ENZ. 2

Re : Hydrolyse de l'acide glycyrrhizique par C1H N
en opérant à l'ébullition à reflux, 12 heures.

Sc : Hydrolyse de l'acide glycyrrhizique par C1H N
en opérant en tube scellé, 21 heures.

Interprétation :

A reflux, la fraction osidique est séparée de l'aglucone, mais la liaison osidique qui relie les acides uroniques n'est pas rompue.

En tube scellé, une très petite quantité de l'acide glucuronique est séparée de la fraction initiale.

L'hydrolyse enzymatique, que ce soit sur l'acide glycyrrhizique ou sur la fraction osidique (respectivement ENZ.1 et ENZ.2) libère des acides glucuroniques.

Il apparaît deux très petites taches colorées en bleu par le réactif aniline-diphénylamine, qui correspondraient au monose.

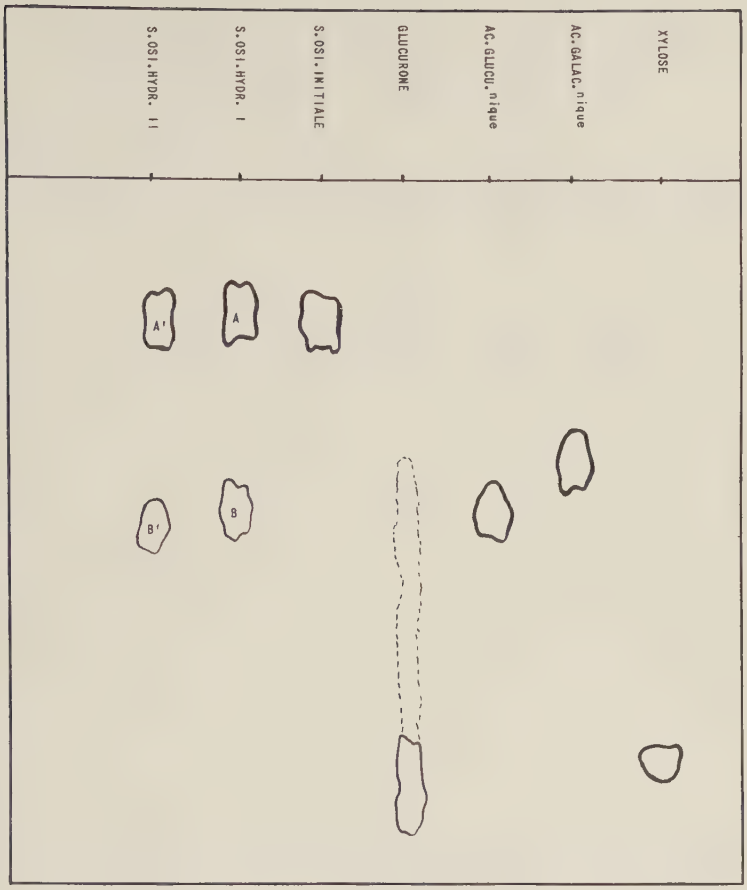


Fig. 2 - Chromatographie sur papier de la fraction osidique provenant de l'hydrolyse acide de l'acide glycyrrhizique. Système de solvant n° 1. Durée de migration : 21 h. Révélateur : aniline-diphénylamine.

L'absence d'acide galacturonique est confirmée.

Chromatogramme reproduit sur la figure n° 5

Avec les renseignements fournis par le chromatogramme précédent, nous avons voulu identifier le monose. A notre grande surprise, la tache bleu disparaît.

3) Chromatographie de ENZ.1 et ENZ.2 en présence des témoins constitués par : glucose, acide glucuronique, acide galacturonique, galactose, glucurone, extrait du suc digestif d'helix prometia :

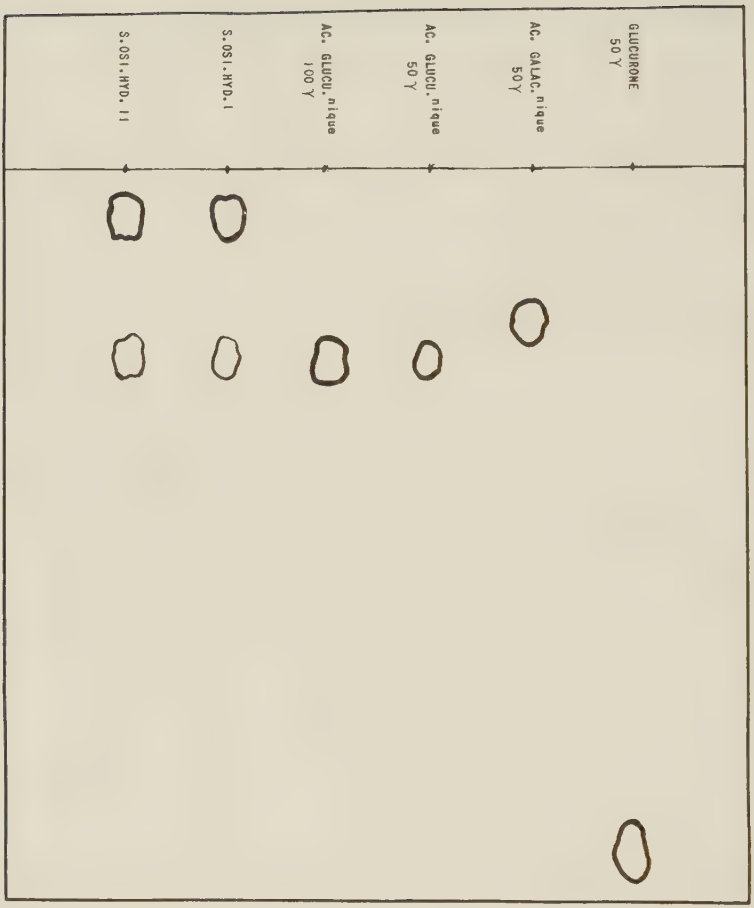


Fig. 3 - Chromatographie sur papier de la fraction osidique provenant de l'hydrolyse acide de l'acide glycyrrhizique. Système de solvant n° 2. Durée de migration : 21 h. Révélateur : aniline-diphénylamine.

Valeurs des Rg :

Acide galacturonique	: 63,4		
Acide glucuronique	: 69,8		
Glucose	: 100		
Galactose	: 92		
Glucurone	: trainée		
Hel. prom.	: 100		
Enz 1 : tache Br	: 68,3	tache Bl	: 99,2
Enz 2 : tache Br	: 69,8	tache Bl	: 100,0

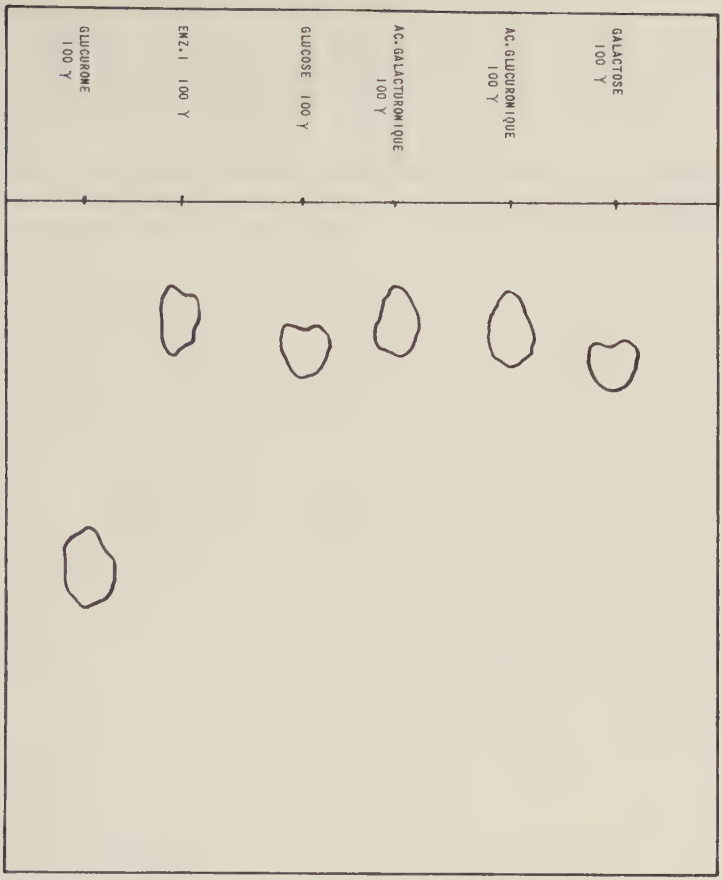


Fig. 4 - Chromatographie sur papier de la fraction osidique issue de l'hydrolyse enzymatique de l'acide glycyrrhizique. Système de solvant n° 1. Durée de migration : 21 h. Révélateur : Aniline-diphénylamine.

Interprétation :

La tache bleue signalée dans le chromatogramme 3 provient de la solution "Helix prometia" qui renferme la glucuronidase.

Cette affirmation se trouve renforcée par la comparaison de l'intensité des taches représentant l'acide glucuronique et le glucose. En effet, si la fraction osidique était composée du glucose et de l'acide glucuronique, l'intensité des taches devraient traduire une quantité équivalente d'un sucre par rapport à l'autre ; ce n'est pas notre cas.

Nous avons sciemment étalé la tache représentant ENZ 2. Ceci pour un double but :

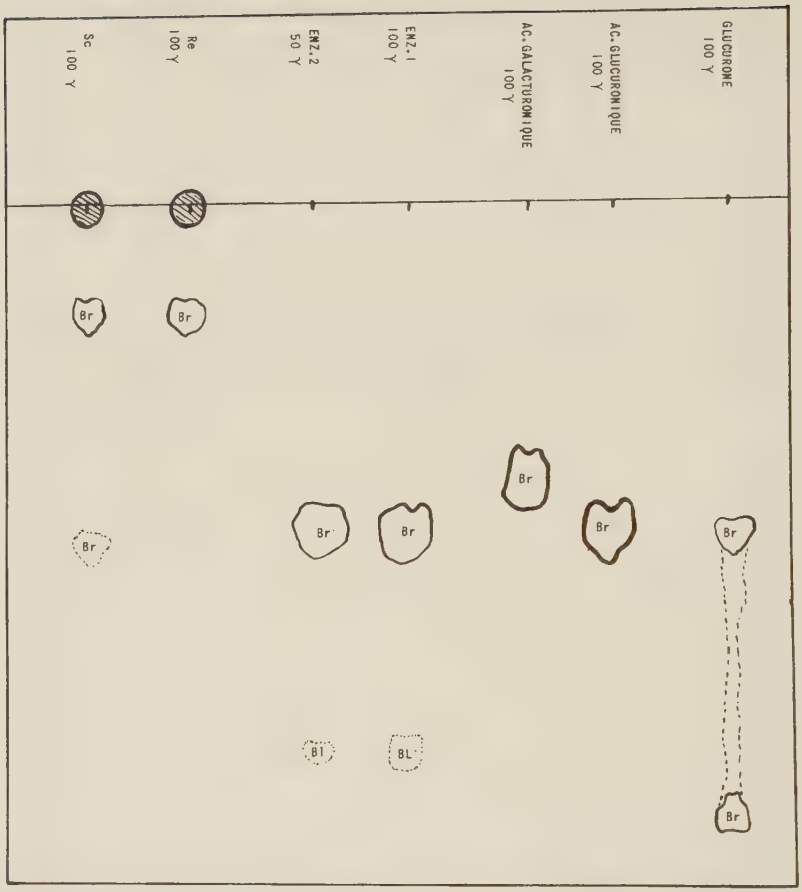


Fig. 5 - Chromatographie sur papier de la fraction osidique issue de l'hydrolyse enzymatique de l'acide glycyrrhizique. Système de solvant n° 2. Durée de migration : 18 h. Révélateur : Aniline-diphénylamine.

- révéler la tache correspondante à l'acide glucuronique par le naphtorésorcinol et par l'aniline-diphénylamine.

- étudier par les microméthodes courantes, le glucose éventuellement apparu (nous avons jugé inutile de faire cette étude, quand nous avons pu contaster d'une manière quasi-certaine que le glucose est le résultat d'un artefact).

Interprétation générale

De cette étude chromatographique il ressort que la fraction osidique peut être identifiée comme un acide *diglucuronique*. Il est confirmé d'autre part,

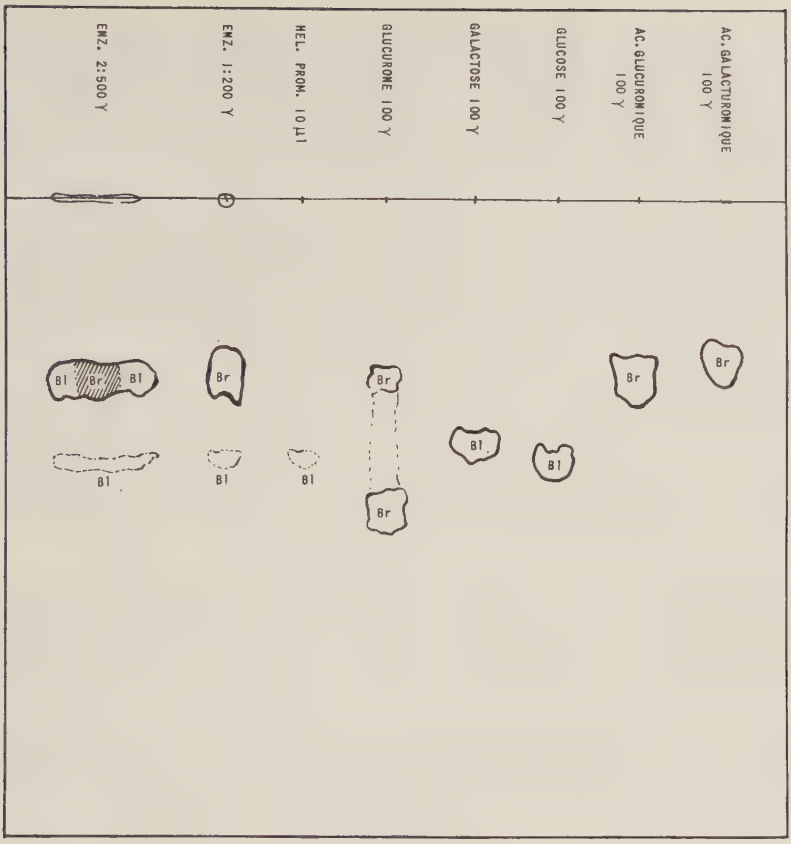


Fig. 6 - Chromatographie de la fraction osidique issue de l'hydrolyse enzymatique de l'acide glycyrrhizique. Système de solvant n° 1. Durée de migration : 10 h.
Révélateur : Aniline-diphénylamine
Bl : Bleu Br : brun

que la liaison osidique qui relie les deux acides glucuroniques est très stable. Cette étude pour être complète, exige l'examen de la nature de cette liaison, ce qui demande la mise en oeuvre des procédés plus compliqués comme la micro-perméthylation. Ce que nous nous proposons d'entreprendre ultérieurement.

IV - AGLUCONE : ACIDE GLYCYRRHETINIQUE

A - Purification

L'acide glycyrrhétinique issu de l'hydrolyse est fortement impur, en raison de la présence des produits de décomposition. La purification se fait

par plusieurs cristallisations dans l'alcool éthylique.

A cet effet, on dissout à chaud l'acide glycyrrhétinique brut dans trois fois son poids d'alcool absolu. On ajoute du charbon actif (Activit XL 50). On filtre la liqueur alcoolique. On ajoute un volume égal d'eau chaude. L'acide glycyrrhétinique précipite. Après deux cristallisations successives, on obtient un produit pur sous forme de micro-cristaux blancs.

Caractères

Au microscope, nous observons les cristaux en forme rhomboïde mélangés à des aiguilles. Ceux-ci sont solubles dans l'alcool éthylique, le chloroforme, l'éther sulfurique, l'acide acétique, moyennement solubles dans l'alcool méthylique, insolubles dans l'eau et l'éther de pétrole.

(Pour les commodités de l'analyse nous appelons le produit obtenu AG *1*).

B - Isomérisation

1) Acide α glycyrrhétinique

Nous avons emprunté la méthode de BEATON et SPRING (1). Ces auteurs ont décrit les acides 18 α et 18 β glycyrrhétiniques.

Mode opératoire

On fait bouillir au reflux 3 g d'acide glycyrrhétinique (AG 1) dans un mélange contenant 100 ml d'acide acétique pur et 10 ml d'acide chlorhydrique concentré, pendant deux heures.

L'acide glycyrrhétinique, peu soluble à froid dans ce mélange, soluble dès que l'ébullition s'installe, redevient insoluble au bout de 5 minutes de chauffage. Au bout d'une demi-heure d'ébullition, on obtient enfin une solution complète qui est maintenue jusqu'à la fin de l'opération.

Cette solution refroidie lentement, abandonne au bout de 10 heures des cristaux blancs d'acide α glycyrrhétinique. La cristallisation est totale au bout de 48 heures.

On recueille les cristaux par filtration sur Buchner. Ceux-ci sont lavés à l'eau distillée tiédie pour éliminer la plus grande partie de l'acide acétique et de l'acide chlorhydrique. On sèche sous vide.

Après cette première opération, l'acide α glycyrrhétinique obtenu (1,8 g) est pratiquement pur. Néanmoins, il reste toujours une petite quantité d'acide acétique qu'on élimine par une recristallisation dans un mélange méthanol-chloroforme. A cet effet, on dissout l'acide brut dans le minimum de chloroforme. On distille sous vide la solution chloroformique jusqu'à apparition du premier trouble. On y ajoute alors un volume de méthanol égal à celui du chloroforme mis au début. Au bout de quelques minutes on observe déjà de beaux brillants cristaux blancs se former. Cette cristallisation s'achève au bout de 24 heures.

L'acide α glycyrrhétinique recueilli, séché sous vide est soumis à l'analyse (AG 2).

2) Acide β glycyrrhétinique

Si l'acide α glycyrrhétinique ne peut être préparé, à notre connaissance que d'une seule manière, l'acide β glycyrrhétinique peut être obtenu par plu-

sieurs procédés. En effet, au cours de nos recherches en vue de la purification de l'acide glycyrrhétinique brut, nous avons été amené à appliquer plusieurs méthodes. Il nous est permis de constater d'après les résultats d'analyse que par trois voies différentes, nous avons obtenu trois produits présentant les caractéristiques physicochimiques à peu près identiques. Ils ne diffèrent entre eux que par l'image microscopique.

a) acide β glycyrrhétinique obtenu d'après la méthode de la Société Réglisse ZAN (brevet).

Pour la purification de l'acide glycyrrhétinique brut, nous avons procédé au passage à l'acide acétyl-glycyrrhétinique suivi de la saponification de cet acide par la potasse méthanolique.

- acide acétyl-glycyrrhétinique : faire bouillir pendant 3 heures, 5 grammes d'acide glycyrrhétinique brut dans 30 ml d'anhydride acétique. Après une cristallisation de 24 heures, on reprend le produit cristallisé par un mélange de chloroforme-méthanol (1-3). On distille sous vide jusqu'à apparition des premiers cristaux, puis on laisse achever la cristallisation pendant 48 heures. Après deux cristallisations successives dans ce solvant, on obtient 3,2 g d'acide acétyl-glycyrrhétinique d'un blanc pur.

- Saponification : faire bouillir 3 g d'acide acétyl-glycyrrhétinique pendant une heure avec une solution dans le méthanol de potasse à 5 %. Filtrer le liquide limpide. On précipite ensuite l'acide glycyrrhétinique dans l'eau chlorhydrique. On élimine le chlorure de potassium formé par une recristallisation dans le méthanol.

Acide AG 4 obtenu : 2,8 g.

b) acide β glycyrrhétinique par traitement du glycyrrhétinate de méthyle obtenu par alcoolyse.

A une solution de 10 g d'éther méthylique de l'acide glycyrrhétinique dans 500 ml d'alcool éthylique à 95°, ajouter 25 ml d'une solution à 40 % de potasse dans l'eau. Laisser reposer 48 heures à la température du laboratoire. Ajouter 500 ml d'eau. Il se précipite une petite quantité d'éther méthylique non saponifié. Après séparation, on porte la liqueur filtrée à l'ébulliton. On neutralise la solution bouillante par l'acide sulfurique à 10 % : la solution jaune en milieu alcalin devient incolore en milieu légèrement acide. Par refroidissement lent, les cristaux se forment, mais il s'agit d'un mélange d'acide glycyrrhétinique et de sulfate de potassium. Eliminer le sulfate de potassium par dissolution de la masse cristalline dans 250 ml d'alcool absolu : seul l'acide glycyrrhétinique passe en solution. On l'isole ensuite par précipitation dans un volume égal d'eau distillée.

Acide AG 5 obtenu : 3,3 g

3) Analyses des acides glycyrrhétiniques obtenus

Il n'est pas question ici de procéder à des analyses élémentaires car ces travaux ayant pour but de déterminer les formules brute et développée de la molécule ont été largement étudiés. Nos analyses sont limitées à la mesure du point de fusion, à la détermination du pouvoir rotatoire, à l'examen microscopique. Nous étudierons plus particulièrement le comportement spectrophotométrique dans l'ultra-violet et dans l'infra-rouge des acides α et β glycyrrhétiniques.

Techniques analytiques

- Point de fusion : Les points de fusion ont été déterminés au Bloc Maquenne. Les températures ne sont pas corrigées.

- Pouvoir rotatoire : Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés à l'aide du polarimètre de Jobin et Yvon dans les conditions suivantes :

Température : 20°C.
Longueur du tube : 2 décimètres.
Solvant : chloroforme.
Concentration : environ 1/100.

- Spectres ultraviolets : Les spectres ultraviolets ont été obtenus à l'aide du spectrophotomètre Beckmann, modèle DU.

- Spectres infrarouges : Les spectres infrarouges ont été mesurés avec un appareil de Perkin Elmer, modèle n° 21, au Laboratoire d'Hormonologie et de Métabologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille*.

Résultats

Nous réunissons dans le tableau IX les résultats analytiques obtenus. L'examen de ce tableau nous permet de remarquer que les échantillons AG 4, AG 5 ont sensiblement le même pouvoir rotatoire et le même point de fusion. Nous avons pensé utile de grouper dans le même tableau (tableau X) les caractéristiques des isomères α et β relevés dans la littérature afin de les comparer avec les nôtres.

Tableau X

Résultats d'analyse des acides glycyrrhétiniques préparés au cours de ce travail.

Analyse	AG 1	AG 2	AG 4	AG 5
Microscopie	rhomboïdes + aiguilles	rhomboïdes	aiguilles fines	aiguilles allongées
Point de fusion	283°C	325°C	300°C	301°C
Pouvoir rotatoire $(\alpha)^{D}_{20}$ ($CHCl_3$)	+ 145°	+ 102°	+ 161°	+ 160°

- Spectres ultraviolets : Les spectres ultra-violets des acides glycyrrhétiniques AG 2 et AG 4 sont représentés par les figures 7 et 8. Nous remarquons que dans le solvant éthanol, les maximum d'absorption

---

*Nous remercions vivement M. le Professeur J. VAGUE qui nous a accordé l'hospitalité. Nos remerciements vont en particulier au Docteur J.C. GARRIGUES, Chef de Laboratoire ainsi que son assistante, Madame GAMBINO, qui nous ont obligatoirement déterminé ces spectres.

Tableau XI

Caractéristiques des isomères α et β

AUTEUR	Microscopie		Point de fusion		Pouvoir rotatoire	
	α	β	α	β	α	β
VOSS	paillettes	aiguilles	283°C	296°C	+ 140° (éthanol)	+ 86°
RUZICKA	paillettes	aiguilles	287°-293°C	300°-304°C	+ 163° (chloroforme)	+ 161°
BEATON et SPRING	"rectangular plate"		321°-323°C		+98° ±4° (chloroforme)	
Nous	rhomboïde	aiguilles	325°C	300°C	+ 102° (chloroforme)	+ 160°

sont sur la même longueur d'onde, tandis que en milieu chloroforme-méthanol, le maximum d'absorption de l'isomère α se déplace vers les petites longueurs d'onde.

- Spectres infrarouges : Les figures 9, 10 et 11 où sont représentés côte à côte les spectres infrarouges des isomères α et β permettent de faire une étude comparative. Ces spectres sont réalisés de la manière suivante :
Prisme en chlorure de sodium et en fluorure de lithium ; la substance est, soit en suspension dans le nujol, soit en solution dans le chloroforme.

Interprétation

- Les spectres reproduits par la figure 9 permettent de distinguer :

1) les groupements fonctionnels de l'acide glycyrrhétinique :

a) la fonction carboxyle - $C\overset{O}{\underset{OH}{}}$ se traduit par une bande très forte vers 5,87 μ (1702 cm^{-1}) correspondant à la fréquence de - C = Ō du carboxyle dissymétrique.

b) la fonction carbonyle se traduit par la forte bande à 5,84 μ (1695 cm^{-1}), fréquence de cétone α β insaturée.

2) les différences entre les deux isomères dans la zone s'étendant de 7,95 μ à 9,7 μ (1257 cm^{-1} à 1024 cm^{-1}). On peut distinguer un déplacement des bandes de l'isomère α vers les fréquences plus basses, surtout un pic très net vers 9,88 μ (1012 cm^{-1}). Or les travaux de BERGMANN et PINCHAS (4) ont montré que cette bande était relative à l'apparition d'une liaison du type lactone.

- Les spectres des figures 10 et 11 ont été obtenus en utilisant le prisme à fluorure de lithium et avec les substances en solution dans le

Fig. 7 - Spectres ultraviolets des acides α et β glycyrrhétiniques, en milieu éthanolique.

•——•β

□——□α

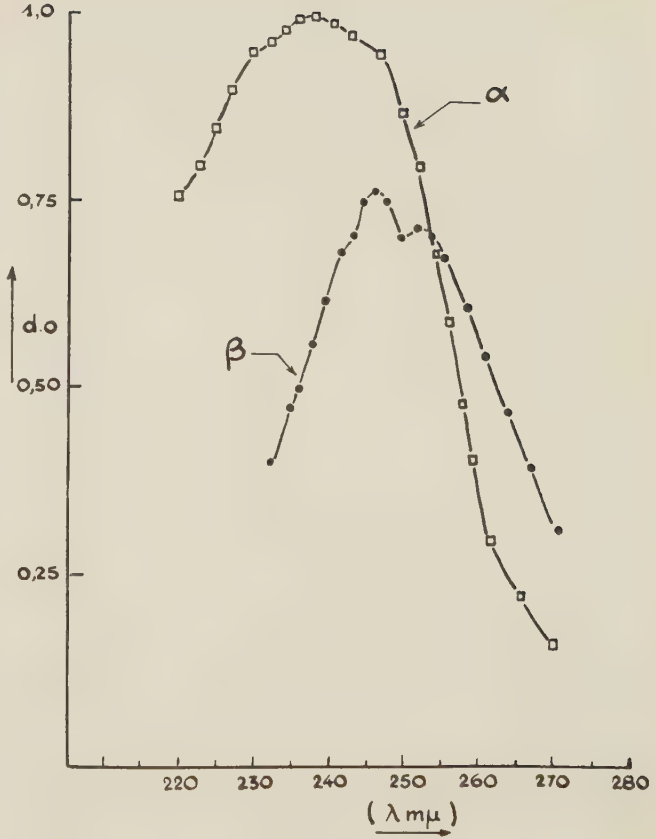


Fig. 8 - Spectres ultraviolets des acides α et β glycyrrhétiniques, en milieu chloroforme-méthanol.

•——•β

□——□α

nujol ou en solution dans le chloroforme. Ils montrent que la bande à 2,67 μ (3615 cm^{-1}) correspondant au OH libre, forte dans le spectre de l'isomère β, est considérablement diminuée (fig. 11) ou a disparu (fig. 10) dans le spectre de l'isomère α. Ces observations tendent à démontrer que le dérivé α représente la substance dans laquelle il s'est formée une liaison interne entre le groupement OH et le groupement COOH.

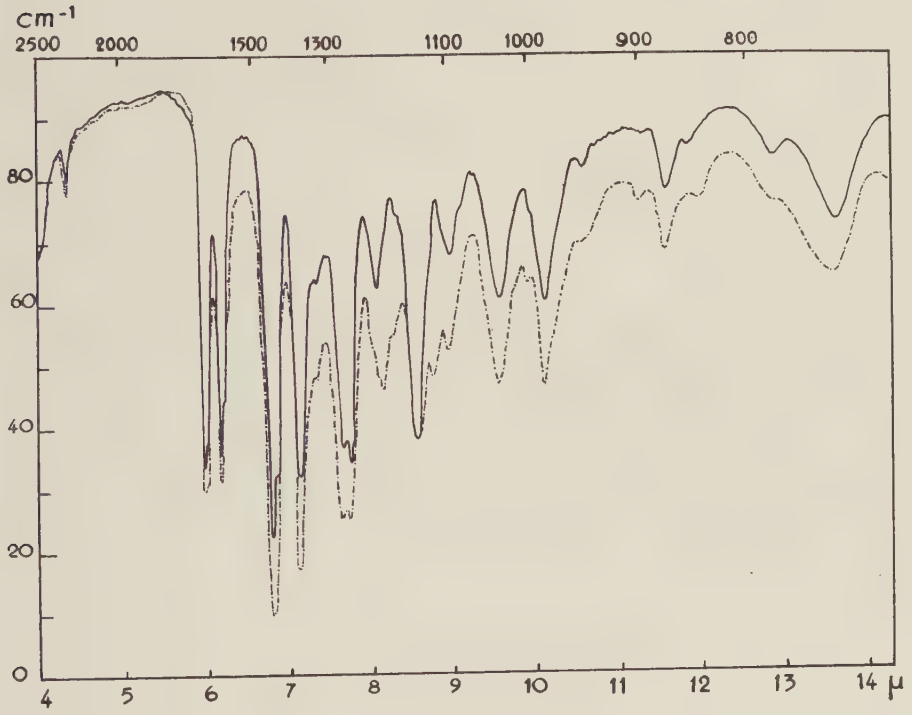


Fig. 9 - Spectre IR de l'acide glycyrrhétinique AG 2 et AG 4
——— : AG 4 (β) —·—·—·: AG 2 (α)

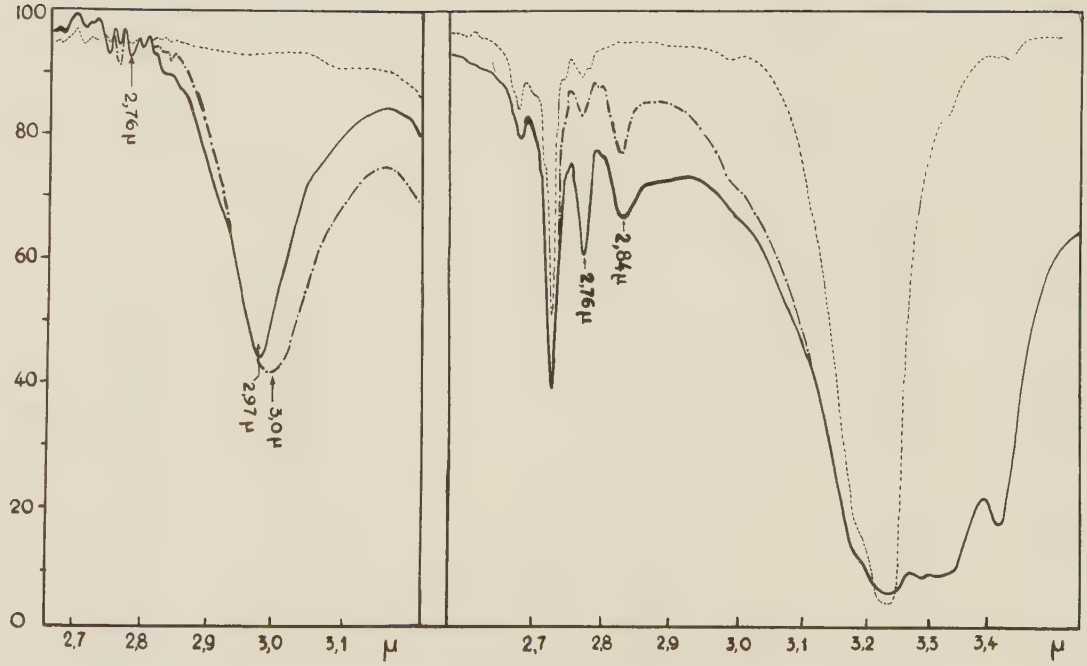


Fig. 10 - Spectres IR de l'acide glycyrrhétinique entre 2,7 µ et 3,2 µ.

——— : AG 4 (β)
—·—·: AG 2 (α)
..... : Nujol

Fig. 11 - Spectres IR de l'acide glycyrrhétinique entre 2,6 µ et 3,5µ

——— : AG 4 (β)
—·—· : AG 2 (α)
. . . . . : Chloroforme

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DES SELS ALCALINS DE L'ACIDE GLYCYRRHIZIQUE

BUT DES RECHERCHES

Depuis les travaux de REVERS (48) et les intéressantes observations de BORST (9) selon lesquelles une administration de doses exagérées d'extrait de réglisse modifie le métabolisme de l'eau et des électrolytes, plusieurs auteurs cherchent à démontrer la similitude d'activité entre les extraits de réglisse et les hormones corticoïdes. L'action dite "cortisone like" a fait l'objet de nombreux travaux parmi lesquels nous relevons ceux de GROEN (22), HASSAN (22), qui confirment "l'effet régulateur de la réglisse sur les électrolytes".

Des études plus poussées essaient de localiser dans l'extrait de réglisse, le principe responsable de cette action, GALAL (19) et MITCHELL (40,41) montrent que ce principe est l'acide glycyrrhétinique. MITCHELL trouve que l'activité de cette substance correspond au 1/20 de celle de la cortisone. En 1956, cet auteur conclut que l'acide glycyrrhétinique peut dans certains cas, remplacer partiellement ou entièrement la désoxycorticostérone dans le traitement de la maladie d'Addison. Récemment, les travaux de FINNEY, SOMERS et WILKINSON (16) confirment les données de GALAL et signalent, en outre, une action antidiurétique marquée et une remarquable tolérance glycyrrhétinique (DL. 50 = 308 mg/kg).

La littérature ne mentionne, cependant, que très peu de travaux consacrés à l'étude de l'acide glycyrrhizique ou de ses sels. Cette lacune trouverait une explication dans le fait que ces substances n'ont pas été isolées à l'état pur, ou encore, que leurs propriétés physiques et chimiques ne sont pas aussi bien déterminées que celles de l'acide glycyrrhétinique.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de reprendre l'étude de l'action minéralocorticoïde avec les sels alcalins de l'acide glycyrrhizique dont les caractéristiques chimiques ont été décrites dans la première partie de ce travail. Le choix des sels à la place de l'acide glycyrrhizique lui-même se justifie par leur solubilité en milieu aqueux, ce qui facilite leur administration par voie intrapéritonéale ou intraveineuse.

Au cours de nos études, nous avons été amené à adapter pour chaque expérience un sel approprié, ceci afin d'éviter les doutes possibles dans l'interprétation des résultats.

CHAPITRE I

TOXICITE ET ACTION HEMOLYTIQUE

I - TOXICITE - DETERMINATION DE LA DOSE MOYENNE LETHALE (DL. 50)

La dose moyenne léthale est étudiée chez la souris sur une solution aqueuse de glycyrrhizate de potassium administrée par voie intrapéritonéale. On compte le nombre de morts par dose injectée au bout de 48 heures. On calcule la DL. 50 en appliquant la formule classique de KARBER et BEHRENS :

$$DL.\ 50 = D\ L.\ 100 - \frac{\Sigma\, ab}{m}$$

a : moyenne des animaux morts par deux doses successives
b : différence en mg entre deux doses successives

$$m : \frac{\text{total des animaux expérimentés}}{\text{nombre d'expériences.}}$$

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau XII

Détermination de la DL. 50 du glycyrrhizate de potassium.

Dose mg / kg	700	800	900	1000	1200	1400	1600	1800	2000
Animaux expérim.	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Animaux morts	0	1	1	1	1	2	3	5	6

DL. 100 = 2000
Σab = 3150
m = 6

$$DL.\ 50 = 2000 - \frac{3150}{6} = 1475 \text{ mg/Kg I.P.}$$

II - ACTION HEMOLYTIQUE

L'acide glycyrrhizique étant considéré comme une saponine, nous avons essayé de voir son comportement vis-à-vis de la résistance hémolytique des globules rouges sanguins.

A - Etude "in vitro"

Le but de cette expérience est de déterminer la concentration de glycyrrhizate de sodium qui provoque l'hémolyse des globules rouges de Lapin. Cette étude comporte deux temps :

1) Détermination de la résistance globulaire du Lapin

Les hématies de sang de Lapin fraîchement prélevé sont lavées trois fois avec du sérum physiologique. Dans une série de tubes à hémolyse, on introduit des solutions de chlorure de sodium de concentration variable puis on ajoute II gouttes de suspension d'hématies lavées dans chaque tube. On les met à l'étuve à 37°C. Au bout de six heures, on repère les tubes dans lesquels le sang est hémolysé.

Tableau XIII

Résistance hémolytique des globules rouges de Lapin.

Concentrations des solutions de NaC1 (g/1)	5	6	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11	12
Hémolyse	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+

2) Index hémolytique du glycyrrhizate de sodium

Le tableau ci-dessus nous indique que pour des concentrations de 7,5 g. par litre, 8 g. par litre, 8,5 g par litre en chlorure de sodium les hématies de Lapin ne sont pas hémolysées. Nous avons donc préparé des solutions de glycyrrhizate de sodium de concentrations croissantes dans une solution à 8 g/litre de chlorure de sodium. Ces solutions sont introduites dans des tubes à hémolyse et on y ajoute des hématies lavées de sang de Lapin. L'observation de la réaction d'hémolyse se fait dans les conditions décrites ci-dessus.

Tableau XIV

Hémolyse des hématies de Lapin par le glycyrrhizate de sodium.

Concentration (g/litre) de solution de glycyrrhizate de sodium.	3,5	2,5	2	1,5	1,25	1	0,5
Hémolyse	+	+	+	0	0	0	0

On observe une réaction hémolytique à partir d'une concentration de 2 g./litre pour le glycyrrhizate de sodium.

B - Etude "in vivo"

Après une administration intrapéritonéale d'une dose unique de 200 mg/kg d'animal de glycyrrhizate de potassium en solution aqueuse à 10 %, nous comparons la résistance hémolytique du sang de l'animal prélevé 6 heures après l'injection avec celle du sang de ce même animal avant le traitement.

1) Sang de Lapin

Tableau XV

Résistance globulaire du sang de Lapin après administration du glycyrrhizate de potassium

Solution de ClNa à (g/1)	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10
Sang avant injection	+	+	0	0	0	+	+	+
Sang après injection	+	+	0	0	0	+	+	+
	hémolysé		non hémolysé			hémolysé		

2) Sang de Chien

Tableau XVI

Résistance globulaire du sang de Chien après administration du glycyrrhizate de potassium

Solution de ClNa à (g/1)	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10
Sang avant injection	+	+	+	+	0	0	0	+	+
Sang après injection	+	+	+	+	0	0	0	+	+
	Hémolysé				non hémolysé			hémolysé	

On observe aucun changement de la résistance hémolytique dans les deux cas.

CHAPITRE II

ACTION SUR LE TAUX DES ÉLECTROLYTES URINAIRES ET SANGUINS CHEZ LES ANIMAUX D'EXPERIENCE

I - METHODES GENERALES D'EXPERIMENTATION

A - Principes généraux

Les animaux (Rats blancs et Lapins) sont placés dans des cages permettant de collecter leurs urines. Ils sont soumis à une période de stabilisation au cours de laquelle nous notons le volume et dosons uniquement les chlorures urinaires. Au bout d'une semaine environ, le taux des chlorures, de sodium et de potassium, et ce, jusqu'à ce que ces taux ne présentent plus de variations notables.

En outre, chez le Lapin et le Chien, nous avons déterminé le taux des électrolytes du plasma sanguin. A cet effet nous prélevons à la veine marginale de l'oreille du Lapin 1 ml de sang ou à la veine saphène du Chien 3 ml (on empêche la coagulation rapide en rinçant la seringue et l'aiguille avant le prélèvement avec une solution d'héparine). Le sang prélevé est immédiatement centrifugé pendant 5 minutes à 4000 tours/minute. On sépare rapidement le plasma.

Les injections journalières sont pratiquées par voie intrapéritonéale pendant trois ou quatre jours consécutifs.

B - Techniques analytiques

1) Dosage des chlorures :

a) urinaires : par la méthode classique de Charpentier-Volhard

b) sanguins : par la méthode de Schales et Schales (57)

2) Dosage du sodium et du potassium - par spectrophotométrie de flamme (appareil Electro-synthèse).

3) Expression des résultats :

a) les résultats des expériences sur le Rat sont exprimés en g/litre. et meq/litre.

b) les résultats des expériences sur le Lapin et le Chien sont exprimés en milliéquivalent-grammes par litre.

II - EXPERIENCES SUR LE RAT BLANC

A - Méthode expérimentale

Nous avons réalisé les conditions expérimentales suivantes inspirées de celles décrites par LIPSCHITZ (37).

a) Cage à diurèse : Les Rats sont placés isolément dans une cage métallique cylindrique (Fig. 12). Un entonnoir placé au-dessous de la cage permet de diriger l'urine émise vers un flacon en verre pyrex. Le sommet

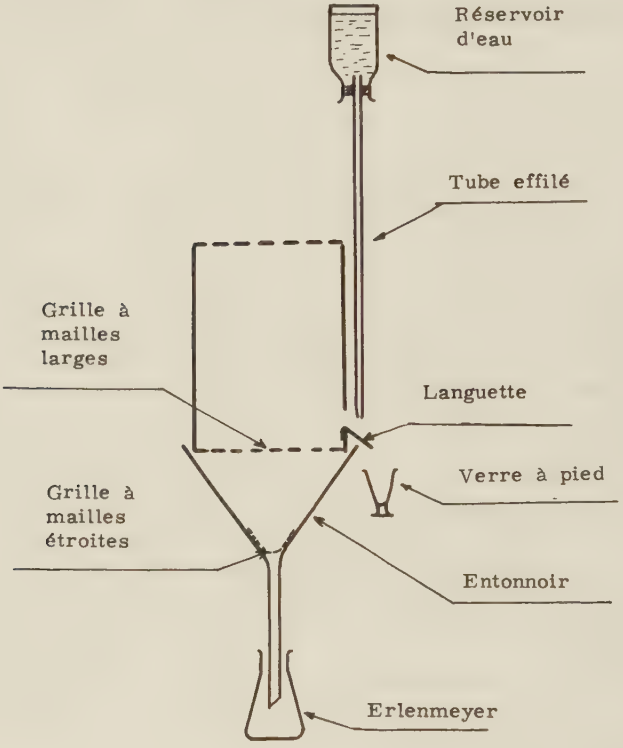


Fig 12 Cage à diurèse. Etude chez les rats.

du cône de l'entonnoir est garni d'une grille à trame fine permettant d'arrêter les déjections. Dans la paroi de la cage est pratiquée une petite fenêtre en face de laquelle aboutit un tube effilé en relation avec un réservoir d'eau fixé au-dessus de la cage. A la suite d'un séjour d'adaptation plus ou moins long, les Rats sont conditionnés et viennent s'abreuver d'eux-mêmes à l'extrémité du tube en retirant par succion la quantité d'eau qui leur est nécessaire. Si une certaine quantité d'eau coule fortuitement par le tube, elle vient tomber dans un verre à pied placé sous une languette, laquelle est placée dans l'axe du tube.

b) Récolte des urines : Les Rats soumis à un régime alimentaire

constitué de pain, salade et provende, ne mangent *qu'en dehors* de leur cage, de 9 heures à 15 heures. On les met ensuite dans leur cage où ils peuvent recevoir de l'eau à volonté. Les urines sont recueillies entre 15 heures et 9 heures le lendemain. Les cages, les entonnoirs et les flacons sont lavés et rincés à l'eau distillée puis séchés avant d'y remettre les animaux.

B - Etude chez le rat femelle - action de doses répétées

Dans une première expérience effectuée sur quatre rats femelles dont le poids varie entre 250 g et 300 g, nous avons administré par voie intrapéritonéale une solution aqueuse à 10 g/litre de glycyrrhizate d'ammonium, à la dose de 100 mg par kilogramme d'animal et par jour, pendant 4 jours consécutifs.

Les courbes de la figure 13 représentent les modifications du taux des électrolytes (taux moyen de quatre Rats).

L'examen de ces courbes permet de constater qu'une administration de glycyrrhizate d'ammonium provoque une diminution du taux de chlorures et de sodium urinaires, tandis que celui du potassium est augmenté.

C - Variation du taux des électrolytes en fonction de la quantité de glycyrrhizate d'ammonium administrée

L'expérience précédente nous a donné une valeur grossière de ces variations. Nous avons voulu dans les expériences suivantes, les penser en fonction de la quantité de produit injecté.

1) Chez le Rat femelle :

Les Rats blancs femelles d'un poids variant entre 220 g et 300 g sont divisés en cinq groupes de deux. Après une période de stabilisation d'une vingtaine de jours, on détermine le taux des électrolytes trois jours avant le traitement. On prend le taux moyen de trois jours sur chaque groupe. Les injections sont ensuite pratiquées avec les doses suivantes de glycyrrhizate d'ammonium, en solution aqueuse à 10 g/litre.

mg/kg = témoin : 0, 25, 50, 100, 150.

On détermine ensuite le taux moyen d'électrolytes correspondant à trois jours de traitement sur chaque groupe. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XVII où les variations sont traduites par le pourcentage en pertes ou en gains entre le taux des électrolytes urinaires de l'animal non traité et le taux des mêmes électrolytes de l'animal traité.

Interprétation des résultats

L'examen du tableau fait ressortir les remarques suivantes :

- l'action anti-diurétique signalée dans la littérature à propos de l'acide glycyrrhétinique est difficile à observer dans notre cas. L'explication pourrait être donnée par le fait que chez le Rat femelle, nous avons observé une rétention d'eau tous les quatre ou cinq jours (influence du cycle menstruel ?)

- il semble exister un seuil de l'action qui se situe à 25 mg/Kg.

A la suite de ces premières constatations il est hasardeux, surtout si l'on tient compte de la rétention périodique de l'eau chez le Rat femelle d'interpréter convenablement cette expérience.

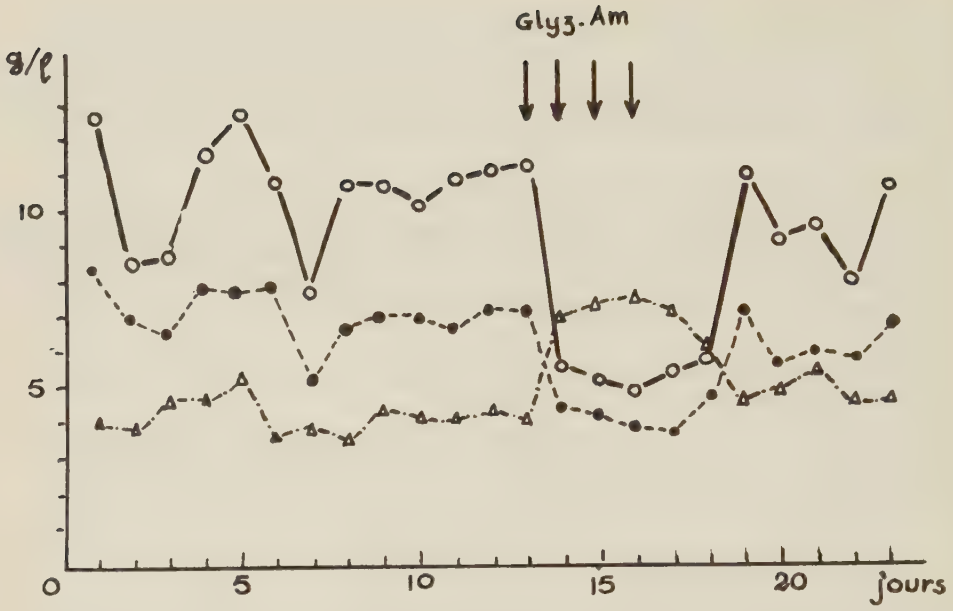


Fig. 13 - Action du glycyrrhizate d'ammonium sur les électrolytes urinaires, chez le Rat femelle. Injection I.P., 100 mg/Kg par jour, pendant 4 jours. Taux moyen de 4 Rats.

○——○: chlorures
●- - - -●: sodium
△-·-·-△: potassium

Tableau XVII (a)

Action du glycyrrhizate d'ammonium sur les électrolytes urinaires chez le Rat femelle. Etude en fonction de la quantité de produit administré. Volume et chlorures

Groupe de Rats n°	Dose mg/Kg	Volume ml		Chlorures				Variation %
		non traité	traité	g/litre		meq/litre		
				non traité	traité	non traité	traité	
1	témoins	6	7	9,58	8,99	270	251	- 7,4
2	25	9	9	8,52	7,03	240	198	- 17,5
3	50	10	11	8,87	6,03	250	170	- 32
4	100	8	5	8,52	4,52	240	127	- 47
5	150	8	7	8,41	5,21	237	147	- 38

Tableau XVII (b)

Action du glycyrrhizate d'ammonium sur les électrolytes urinaires chez le Rat femelle. Etude en fonction de la quantité de produit administré ; Sodium et potassium

Groupe de Rats n°	Dose mg/kg	Sodium					Potassium				
		g/litre		meq/litre		Variation %	g/litre		meq/litre		Variation %
		non traité	traité	non traité	traité		non traité	traité	non traité	traité	
1	témoin	5,89	5,52	256	240	- 5,8	3,55	3,54	9,1	8,6	+ 5,5
2	25	5,89	4,76	256	207	-19	3,86	4,41	9,9	11,3	+14,0
3	50	6,62	4,37	288	190	-34	3,43	7,80	8,8	20,0	+127
4	100	6,65	4,02	289	175	-39,5	4,87	9,75	12,5	25,0	+100
5	150	6,51	4,02	283	175	-38,2	4,57	9,24	11,7	23,7	+102

Nous l'avons donc reprise :

2) Chez le Rat mâle :

Les animaux d'un poids moyen de 250 g sont divisés en quatre groupes de deux. Dans un premier temps après une période de stabilisation, nous injectons le glycyrrhizate d'ammonium en solution aqueuse, aux doses suivantes :

groupe I : témoin : 0 mg/kg
groupe II : 25 -
groupe III : 50 -
groupe IV : 100 -

Les urines sont recueillies et la détermination du taux des électrolytes s'est effectuée selon le protocole décrit.

Après une seconde période de stabilisation d'environ trois semaines, au cours de laquelle la substance administrée est complètement éliminée et le taux des électrolytes redevenu normal, nous procédons à une seconde injection de glycyrrhizate d'ammonium aux doses suivantes :

groupe I b : 150 mg/kg
groupe II b : 200 mg/kg
groupe III b : 250 mg/kg
groupe IV b : 300 mg/kg

Nous reportons sur le tableau XVIII les résultats obtenus. Dans la figure 14 sont représentés les gains et pertes en électrolytes ainsi que la diminution du volume des urines recueillies. L'action anti-diurétique est apparue ici d'une manière très nette ; la dose optimum qui détermine cette action est située vers 100 mg/kg.

III - EXPERIENCES SUR LE LAPIN

A - Méthode expérimentale

Les Lapins sont isolés dans les cages à diurèse permettant de recueillir les urines émises. Ils sont soumis à un régime alimentaire spécial, constitué par 100 g de blé ou d'avoine, 40 g de pain, 40 g d'eau.

Les urines sont recueillies toutes les 24 heures et les cages sont nettoyées et rincées à l'eau distillée.

Il est en outre procédé à un prélèvement de sang par la veine marginale de l'oreille de l'animal, trois jours avant, trois jours pendant et trois jours après le traitement, à raison d'un millilitre environ chaque fois. Ce sang est destiné à l'étude des électrolytes du plasma sanguin.

Les résultats sont exprimés en :

- milliéquivalent-gramme par 24 heures (meq/24 h), en ce qui concerne les urines,

- milliéquivalent-gramme par litre en ce qui concerne le plasma sanguin.

B - Etude en fonction de la dose de glycyrrhizate d'ammonium administrée

L'expérience est effectuée sur cinq lapins, dont un nous sert de témoin (Lapin F 1). Les autres reçoivent respectivement :

Lapin F 2	:	50 mg/kg
Lapin F 3	:	100 mg/kg
Lapin 1 B2	:	200 mg/kg
Lapin 3 B2	:	300 mg/kg

Les résultats reportés dans les tableaux XIX et XX et dans les figures 15 et 16 nous permettent :

- de confirmer l'action anti-diurétique observée chez le Rat
- de situer la dose optimum de l'activité minéralocorticoïde entre 100 mg/kg et 200 mg/kg.

- de constater la parfaite réversibilité de l'action puisque le taux moyen de trois jours après le traitement est redevenu sensiblement normal.

En outre, il est constaté que le glycyrrhizate d'ammonium provoque une légère hypokaliémie et une légère hyperchlorémie et hypernatrémie.

C - Etude comparée des actions des sels d'ammonium, de potassium et de sodium de l'acide glycyrrhizique

Nous avons voulu voir dans cette expérience si le glycyrrhizate d'ammonium, le glycyrrhizate de potassium et le glycyrrhizate de sodium ont les mêmes influences sur les électrolytes du plasma sanguin ; dans le seul but de contrôler les résultats, nous ne procédons qu'au dosage des chlorures

Tableau XVIII (a)

Action du glycyrrhizate d'ammonium sur les électrolytes urinaires chez le Rat mâle Etude en fonction de la quantité de produit administré.Volume et Chlorures

Groupe de Rats n°	Dose Mg/Kg	Volume ml		Chlorures				Variation %
		non traité	traité	g/litre		meq/litre		
				non traité	traité	non traité	traité	
I	témoin	6	5,5	10,01	9,91	282	281	0
II	25	5	3,5	9,85	9,53	277	268	- 3,2
III	50	6	3	9,92	7,50	279	211	-24,3
IV	100	7	2	8,59	5,41	242	152	-37,1
I b	150	6	3,5	10,21	6,43	288	181	-37,1
II b	200	7	3,5	9,82	6,30	277	177	-30,1
III b	250	7	4,5	8,89	4,67	250	131	-46,5
IV b	300	7	3,5	8,69	4,39	245	124	-49

Tableau XVIII (b)

Action du glycyrrhizate d'ammonium sur les électrolytes urinaires chez le Rat mâle. Etude en fonction de la quantité de produit administré. Sodium et Potassium

Groupe des Rats n°	Dose mg/kg	Sodium					Potassium				
		g/litre		meq/litre		Variation %	g/litre		meq/litre		Variation %
		non trait.	traité	non traité	traité		non trait.	traité	non trait.	traité	
I	témoin	5,89	5,52	256	240	- 6,2	3,85	3,89	9,9	9,9	0
II	25	5,89	4,76	256	207	-19,1	4,05	5,17	10,4	14,3	+ 28
III	50	6,62	4,37	287	190	-33,8	3,92	6,82	10,0	17,5	+ 75
IV	100	6,55	4,02	285	175	-39,1	3,85	7,45	9,9	19,1	+ 90
I b	150	6,25	2,73	272	119	-56,1	4,02	8,03	10,3	20,6	+100
II b	200	6,35	2,85	276	123	-55,4	3,86	7,49	9,9	19,2	+ 91
III b	250	7,35	3,43	320	149	-53,3	3,72	7,65	9,5	19,6	+106
IV b	300	6,93	3,23	301	140	-53,3	3,90	8,02	10,0	20,6	+106

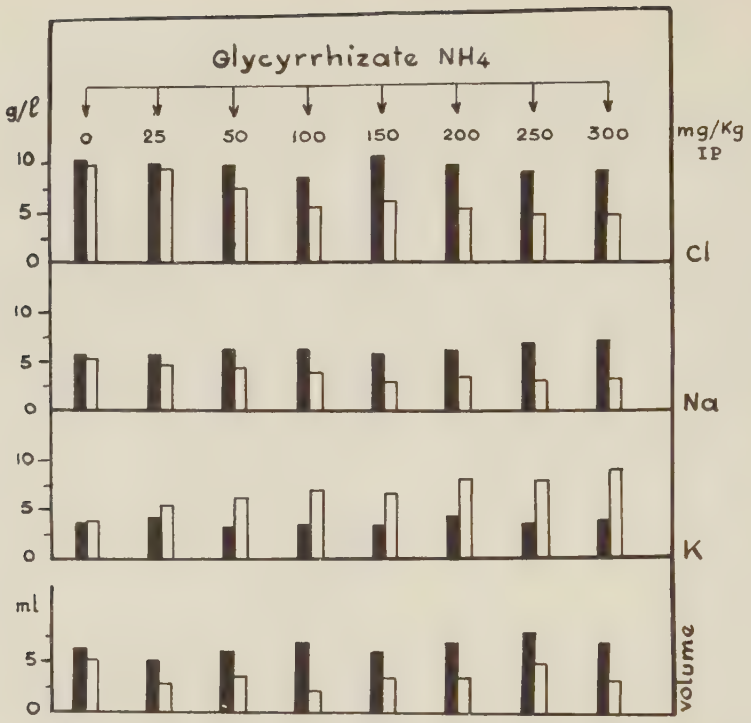


Fig. 14 - Action du glycyrrhizate d'ammonium sur les électrolytes urinaires chez le Rat mâle. Etude en fonction de la quantité du produit administré. Mise en évidence de l'action antidiurétique

non traité

traité

urinaires et qu'à la mesure du volume urinaire recueilli par 24 heures.

Les lapins F 1, F 2, 1 B2 et 3 B2 sont utilisés pour cette expérience dans les conditions suivantes :

Lapin F 1 : témoin (reçoit 3 ml d'eau distillée)
Lapin F 2 : 200 mg/kg de glycyrrhizate d'ammonium
Lapin 1 B2: 200 mg/kg de glycyrrhizate de potassium.
Lapin 3 B_3: 200 mg/kg de glycyrrhizate de sodium.

les sels d'acide glycyrrhizique étant en solution aqueuse à 20 % les injections sont pratiquées par voie intrapéritonéale pendant 3 jours.

Résultats et interprétation

Nous retrouvons résumés dans le tableau XXI les résultats de cette expérience. L'ensemble de ces données montre que :

1) l'action anti-diurétique est semblable dans les trois cas

2) les diminutions du taux des chlorures urinaires sont sensiblement du même ordre dans les trois cas.

Tableau XIX

Action du glycyrrhizate d'ammonium sur les électrolytes urinaires chez le Lapin. Etude en fonction de la dose administrée.

Lapin	F 1	F 2	F 3	1 B2	3 B2
Dose mg/kg	témoin	50	100	200	300
Volume ml/24 heures					
non traité	58	48	57	62	70
traité	57	35	41	13	12
variation (%)	0	- 14,5	- 28	- 79	- 83
Chlorures meq/litre					
avant traitement	223	215	231	210	215
pendant traitement	222	192	184	151	150
variation (%)	0	- 10,7	- 20,3	- 28,1	- 30,6
après traitement	222	210	228	207	207
Sodium meq/litre					
avant traitement	213	205	207	200	207
pendant traitement	214	189	176	163	161
variation (%)	0	- 7,8	- 15	- 18,5	- 22,2
après traitement	212	200	206	201	205
Potassium meq/litre					
avant traitement	36	34	37	31	32
pendant traitement	36	36	39,5	33,5	34,5
variation (%)	0	+ 5,9	+ 6,8	+ 8,0	+ 7,8
après traitement	36	34,5	36,5	31	32,5

3) l'hyperchlorémie et l'hypernatrémie sont confirmées dans les trois cas.

4) l'hypokaliémie est observée dans les cas du sel d'ammonium et de sodium, tandis que dans le cas du sel de potassium, la kaliémie a tendance à augmenter légèrement.

D - Etude cinétique de l'action du glycyrrhizate de sodium sur les électrolytes du plasma sanguin

Au cours de nos expériences effectuées tant sur les Rats que sur les Lapins, nous avons vu que l'acide glycyrrhizique sous forme de sels alcalins exerce une action nette sur le métabolisme de l'eau et celui des électrolytes. Il serait intéressant de localiser le moment où cette action commence à se manifester ainsi que celui où cette action est devenue pratiquement nulle. A cet effet, dans un double but, d'une part, d'étudier les variations des électrolytes du plasma sanguin en fonction du temps, d'autre part l'influence de ce remaniement électrolytique sur le système nerveux central (nous aurons l'occasion de revenir plus longuement sur ce sujet), nous disposons d'un Lapin curarisé. Nous injectons par voie intraveineuse 200 mg/kg d'une solution

Tableau XX

Action du glycyrrhizate d'ammonium sur les électrolytes du plasma sanguin chez le Lapin. Etude en fonction de la dose administrée

Lapin	F 1	F 2	F 3	1 B2	3 B2
Dose mg/kg	témoin	50	100	200	300
Chlorure meq/litre					
avant traitement	124	124	121	123	126
pendant traitement	124	126	130	134	136
variation (%)	0	+ 1,6	+ 7,4	+ 8,8	+ 7,8
après traitement	124	124	122	120	123
Sodium meq/litre					
avant traitement	150	151	154	153	155
pendant traitement	151	155	160	160	161
variation (%)	- 0	+ 2,6	+ 3,9	+ 4,5	+ 3,8
après traitement	151	151	155	150	159
Potassium meq/litre					
avant traitement	3,4	3,7	3,6	3,8	3,8
pendant traitement	3,4	3,65	3,4	3,55	3,6
variation (%)	0	- 1,5	- 5,5	- 6,6	- 5,2
après traitement	3,4	3,65	3,6	3,7	3,6

Tableau XXI

Action comparée des sels d'ammonium, de potassium et de sodium de l'acide glycyrrhizique sur le taux des électrolytes chez le Lapin.

Lapin	Glycyrrhizate de	Urines				Plasma sanguin					
		Volume ml/24		Chlorures		Chlorures		Sodium		Potassium	
		non	traité	non	traité	non	traité	non	traité	non	traité
F 1	témoin	53	52	225	225	125	125	150	151	3,4	3,4
F 2	NH_4	50	14	210	156	124	150	155	166	3,75	3,5
1B2	K	59	14	210	150	122	140	160	163	3,7	3,75
3B2	Na	65	26	217	162	122	140	158	165	3,65	3,30

aqueuse de glycyrrhizate de sodium, puis nous déterminons le taux des électrolytes du plasma sanguin au bout de 30 min., 60 min., 90 min., 120 min., 180 min., et 240 min.

Les résultats représentés dans le tableau XXII et par les courbes de la

Fig. 15 - Action du glycyrrhizate d'ammonium sur les électrolytes urinaires chez le Lapin. Etude en fonction de la dose administrée.

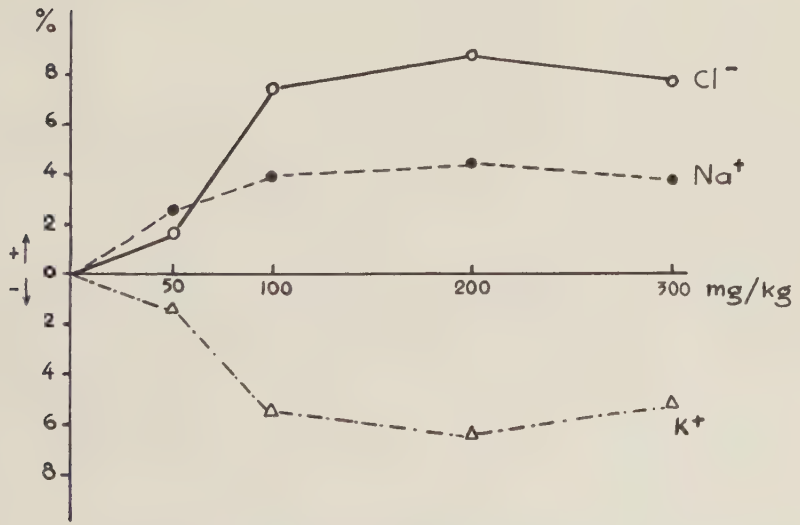


Fig. 16 - Action du glycyrrhizate d'ammonium sur les électrolytes du plasma sanguin chez le Lapin. Etude en fonction de la dose administrée.

figure 17 indiquent une perturbation sérieuse des électrolytes pendant les 120 premières minutes.

En effet, 30 minutes après l'administration du produit le taux de la chlorémie et de la kaliémie atteint son maximum tandis que celui de la natrémie est au minimum.

L'hypernatrémie n'est observée qu'à partir de 120 minutes après le traitement, tandis que l'hypokaliémie déclanchée à la 60me minute revient à son taux normal au bout de 2 heures. La chlorémie semble se régulariser assez rapidement.

Ces remaniements électrolytiques semblent influer sur les tracés de l'électroencéphalogramme, à propos desquels nous aurons l'occasion de revenir.

Tableau XXII

Etude des variations des électrolytes du plasma sangin en fonction du temps après l'administration du glycyrrhizate de sodium (200 mg/kg voie veineuse) chez le Lapin

Temps en minutes	Chlorures meq/litre	Sodium meq/litre	Potassium meq/litre
0	139	132	3,13
30	148	112	4,74
60	140	131	2,87
90	132	130	2,62
120	122	142	2,70
180	122	132	2,70
240	132	147	3,26

IV - EXPERIENCE SUR LE CHIEN

A - Méthode expérimentale

L'étude cinétique des variations des électrolytes du plasma sanguin par action du glycyrrhizate de sodium nous a permis de travailler en comparaison avec les tracés de l'électroencéphalogramme. Nous avons voulu reprendre cette étude chez le Chien. Le Chien est maintenu à son état vivant normal.

Le prélèvement du sang se fait juste avant l'administration du produit puis après l'administration à des intervalles de temps variables, par la voie saphène.

B - Administration du glycyrrhizate de sodium (200 mg/kg)

Chienne pesant 9 kg. L'injection se fait par voie intrapéritonéale. Il est prélevé chaque fois 3 ml de sang.

Nous reportons sur le tableau XXIII et la figure 18 les résultats de cette expérience. Ils nous indiquent :

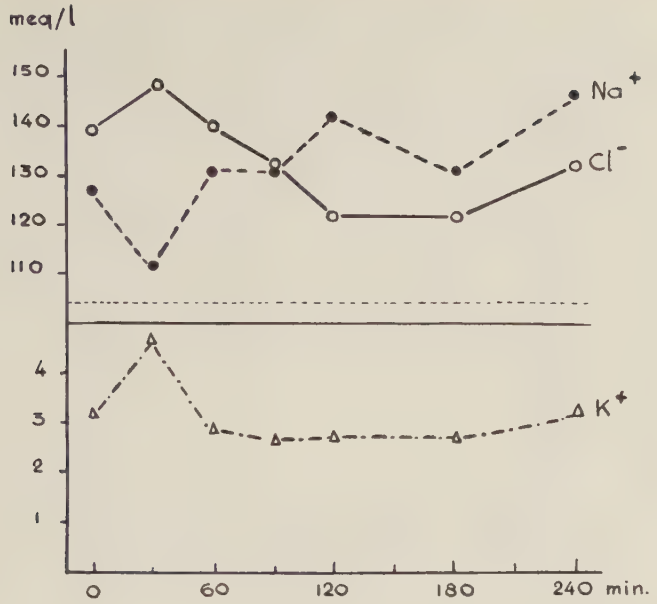


Fig. 17 - Etude des variations des électrolytes du plasma sanguin en fonction du temps après l'administration du glycyrrhizate de sodium par voie veineuse chez le Lapin.

Tableau XXIII

Etude des variations des électrolytes du plasma sanguin en fonction du temps après administration par voie intrapéritonéale du glycyrrhizate de sodium chez le Chien

Temps en minutes	Chlorures meq/litre	Sodium meq/litre	Potassium meq/litre
0	137	155	3,97
30	143	160	3,90
65	149	155	3,80
155	143	165	3,25
220	143	165	3,75
335	143	155	3,55
410	137	162	3,70

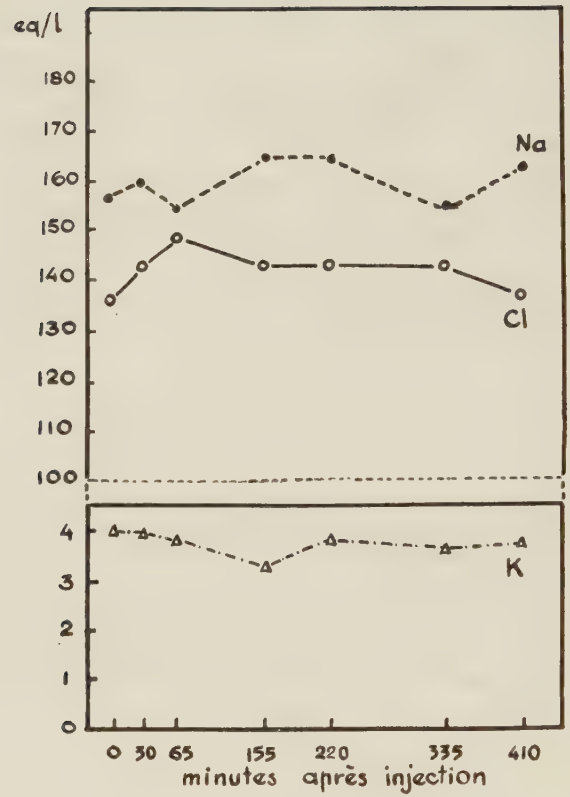


Fig. 18 - Etude des variations des électrolytes du plasma sanguin chez le Chien, en fonction du temps. Administration du glycyrrhizate de sodium.

1) un maximum de la chlorémie 65 minutes après injection du produit. Le taux redevient normal au bout de 7 heures.

2) un maximum de la natrémie 155 minutes après l'injection. L'hypernatrémie est maintenue après 7 heures.

3) un minimum de la kaliémie 155 minutes après l'injection. L'hypokaliémie n'est que partiellement compensée au bout de 7 heures.

C - Administration du glycyrrhizate de potassium (100 mg/kg)

Chienne pesant 11 kg. Injection par voie intrapéritonéale.

Résultats : tableau XXIV et figure 19.

Tableau XXIV

Etude des variations des électrolytes du plasma sanguin en fonction du temps, après administration par voie intrapéritonéale du glycyrrhizate de potassium chez le Chien

Temps en minutes.	Chlorures meq/litre	Sodium meq/litre	Potassium meq/litre
0	128	148	4,50
30	128	144	4,35
60	143	154	4,85
100	136	158	4,30
240	136	150	4,85
360	136	162	5,40

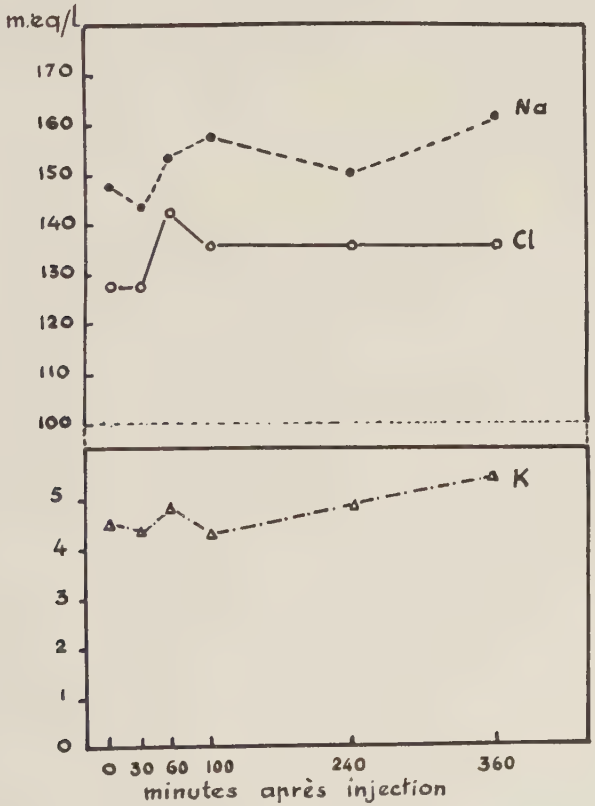


Fig. 19 - Etude des variations des électrolytes du plasma sanguin chez le Chien, en fonction du temps. Administration du glycyrrhizate de potassium.

Nous remarquons que si l'hyperchlorémie et l'hypernatrémie sont maintenues six heures après l'administration du produit, l'hypokaliémie est largement compensée. La kaliémie dépasse même le taux normal au bout de ce temps. Ces données confirment celles obtenues chez le Lapin.

CHAPITRE III

ACTION DU GLYCYRRHIZATE DE SODIUM SUR LE SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE ET LE RYTHME ET LA FRÉQUENCE RESPIRATOIRES

Nous avons utilisé pour cette expérience, le glycyrrhizate de sodium au lieu du glycyrrhizate de potassium pour éviter toute influence de l'ion potassium sur le rythme cardiaque et la pression artérielle. La pression artérielle est enregistrée par l'intermédiaire du manomètre de Ludwig. L'amplitude et la fréquence respiratoires sont enregistrées par l'intermédiaire du pneumographe de Paul-Bert. L'administration du produit se fait par voie intrasaphène. Le chien est chloralosé.

A - Action exercée par des doses successives

Chien de 10 kg.

Nous avons injecté des doses de glycyrrhizate de sodium en solution aqueuse, allant de 20 mg/kg à 200 mg/kg.

Pression artérielle : 20 mg/kg : on n'observe aucune variation importante de la pression artérielle et de la respiration.

30 mg/kg : à partir de cette dose, on remarque une *hypotension* dont la valeur augmente avec la dose. L'effet est durable, le niveau ne revenant pas au niveau initial (voir tableau XXV et la figure 20). Après une administration totale de 400 mg/kg, la pression s'est abaissée de 34,5 %.

Rythme cardiaque : aucune variation, excepté pour la dose de 200 mg/kg où l'on note un ralentissement sensible (diminution de 14 %).

Respiration : Les doses de 30 mg/kg à 100 mg/kg entraînent une dépression respiratoire s'établissant progressivement, surtout marquée sur l'amplitude. A partir de 100 mg/kg la diminution est également marquée sur la fréquence. A 200 mg/kg, une brève apnée est apparue au moment de l'injection (durée 30 secondes) (fig. 20).

Après la dose totale de 400 mg/kg, l'amplitude respiratoire a diminué de 30 % et la fréquence de 13 % (tableau XXV).

Si l'on suit les variations des effets hypertenseurs provoqués par l'administration de 40 gamma d'adrénaline et 30 gamma de nor-adrénaline, sous l'influence des doses successives de glycyrrhizate de sodium, on peut faire les constatations suivantes : (Tableau XXVI).

- Les effets de l'adrénaline et de la nor-adrénaline sont peu modifiés par le glycyrrhizate de sodium : seuls les pourcentages de variation de pression sont légèrement diminués.

- la bradycardie réflexe est augmentée après les doses de 20 + 30 mg/kg ; elle est peu modifiée par la suite.

Tableau XXV

Action du glycyrrhizate de sodium sur la pression artérielle, le rythme cardiaque l'amplitude et la fréquence respiratoires.
Injection intrasaphène des doses successives.

Dose mg/kg	Pression artérielle		Rythme cardiaque		Amplitude resp.		Fréquence resp.	
	cm Hg	Var %	par min.	Var %	cm	Var %	par min.	Var %
normal	11		112		2,4		15	
20	11	0	112	0	2,4	0	15	0
30	11 9,8	-11,8	112 - 112	0	2,4 2,2	-8,3	15 - 15	0
50	11 9,6 10,2	-20 -15	112 - 112 112	0	2,6 1,4 1,8	-46,2	18 - 15 18	0
100	10,2 8,4 9,4	-21,4 - 7,8	112 108 112	-3,6 0	2,2 1,4 1,8	-36,3 -18,2	20 13 12	-35 -40
200	9,4 5,6 7,2	-40,4 -23,4	112 96 96	-14 -14	1,8 -1,8 1,7	0 - 5,5	13 7 13	-46 0
fin expér.	7,2	-34,5	96	-14	1,7	-29,1	13	-13,3

Remarque : Pour les doses de 50, 100, 200 mg/kg, la première ligne représente les variations maxima se situant de 2 à 3 minutes après l'injection ; la seconde ligne représente les variations de la pression artérielle et de la respiration lorsque celles-ci se sont stabilisées (4 à 10 min. après l'injection).

Tableau XXVI

Etude des modifications des effets vasculaires de l'adrénaline et de la nor-adrénaline par le glycyrrhizate de sodium administré par voie intrasaphène chez le Chien

I - Adrénaline

Glycyrrhizate de sodium Dose mg/kg	Prest. art. par minute	Variation %	Rythme card. par minute	Variation %	Durée
normal	11,6 - 16	+ 38	88 - 60	- 31,8	3 min.
20 + 30	9,8 - 13,6	+ 36,7	112 - 56	- 50	2 min. 30
50	10,6 - 14	+ 32	112 - 72	- 35,7	3 min.
100 + 200	7,2 - 9,4	+ 30,5	96 - 72	- 29,2	2 min. 30

II - Nord-adrénaline

Glycyrrhizate de sodium Dose (mg/kg)	Prest. art. par minute	Variation %	Rythme card. par minute	Variation %	Durée
normal	10,8 - 14,8	+ 37	88 - 60	- 31,8	3 min.
20 + 30	11 - 11,4	+ 30,8	112 - 52	- 53,5	3 min.
50					
100 + 200	7,6 - 10,4	+ 36,8	92 - 60	- 34,7	3 min.

B - Action d'une dose unique

Chien de 8 kg.

Nous avons injecté la dose de 100 mg/kg de glycyrrhizate de sodium en solution aqueuse. Nous déterminons ensuite les variations de la pression artérielle, du rythme cardiaque et de l'amplitude et la fréquence respiratoires en fonction du temps pendant 60 minutes.

Le tableau XXVII où sont rassemblés les résultats obtenus indiquent une nette diminution de la présence artérielle 2 minutes après l'injection (- 23,8 %) suivie d'une remontée sans toutefois arriver à la valeur initiale. La fréquence respiratoire est considérablement augmentée, tandis que l'amplitude ainsi que le rythme cardiaque ne sont pratiquement pas modifiés.

La figure 21 permet d'expliciter ces résultats.

Tableau XXVII

Action du glycyrrhizate de sodium sur la pression artérielle, le rythme cardiaque, l'amplitude et la fréquence respiratoire. Injection intrasaphène d'une dose unique

Temps minutes	Pression artérielle		Rythme cardiaque par minute	Respiration	
	cm Hg	var. %		amp. cm	fréq/min
normal	8,4		164	1,2	13
	Injection de glycyrrhizate de sodium : 100 mg/kg				
2	6,4	- 23,8	164	1,1	12
5	7,4		160	1,15	14
10	7,4		156	1,2	14
15	7,0		156	1,3	14
30	7,4		156	1,3	17
45	7,2		160	1,3	20
60	7,2	- 14,3	164	1,3	22

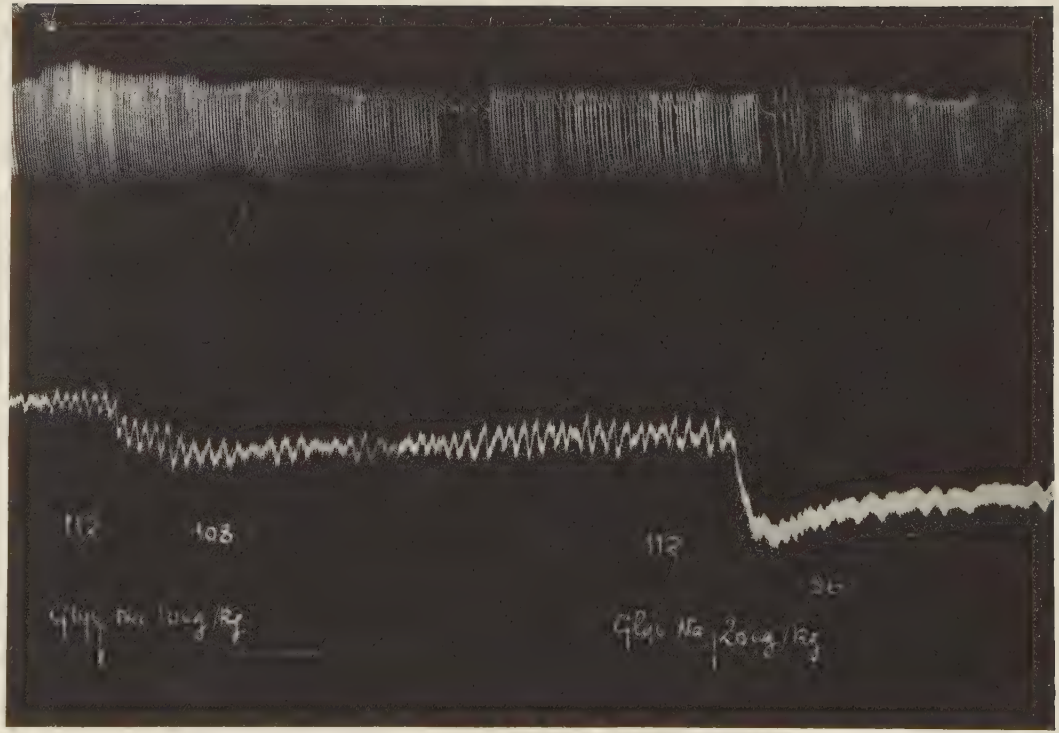


Fig. 20 - Action du glycyrrhizate de sodium sur l'amplitude et la fréquence respiratoires (au-dessus) et sur la pression artérielle (au-dessus)

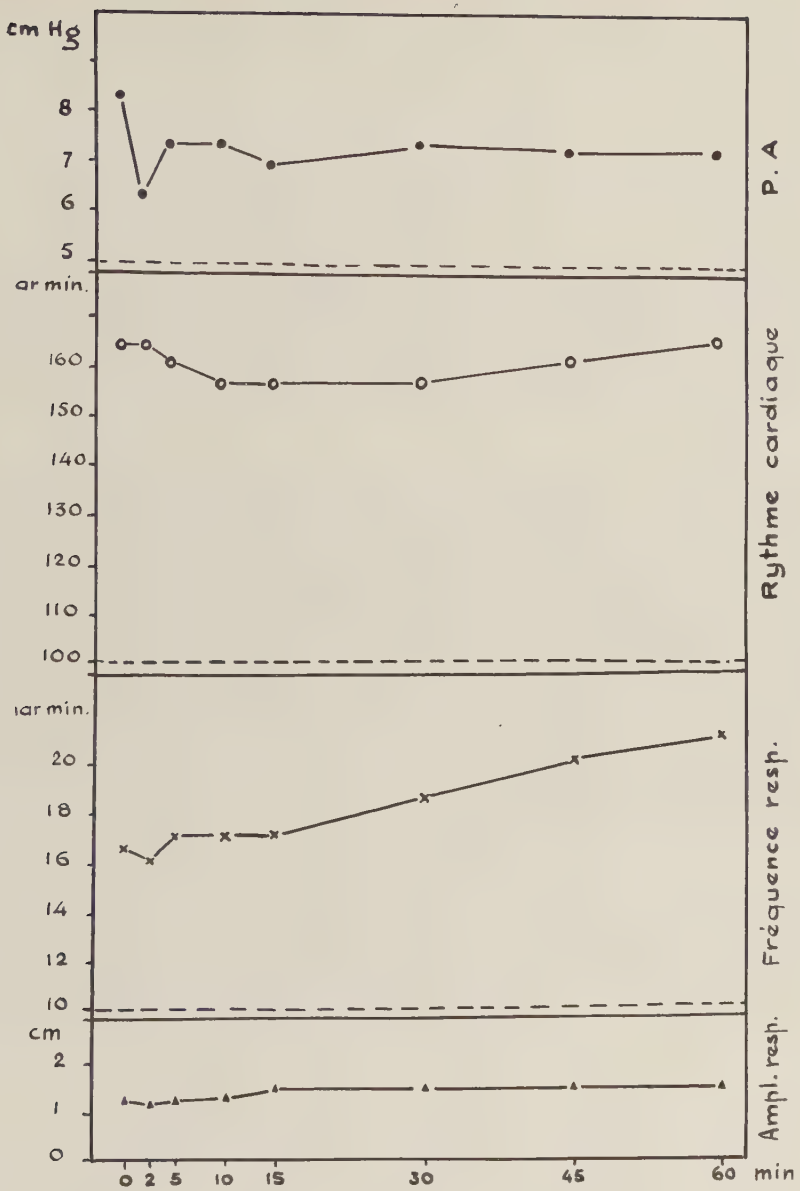


Fig. 21 - Action du glycyrrhizate de sodium sur l'amplitude et la fréquence respiratoires et sur la pression artérielle et le rythme cardiaque.

CHAPITRE IV

ÉTUDE DES EFFETS EXERCÉS PAR LE SEL DE SODIUM DE L'ACIDE GLYCYRRHIZIQUE SUR L'ÉLECTROGÉNÈSE CORTICALE ET LES EXCITABILITÉS CORTICALES ET RÉTICULAIRES

Cette étude a été réalisée chez le Lapin Fauve de Bourgogne. Après préparation sous anesthésie à l'éther, les animaux ont été immobilisés sous respiration artificielle par injection intraveineuse de 2 à 4 mg/kg de triiodoéthylate de gallamine. Les potentiels corticaux ont été recueillis au moyen de vis enfoncées dans des trous de trépan et allant jusqu'à la dure-mère et enregistrés au moyen d'un appareil d'E.E.G. à six canaux. Nous avons utilisé un système de dérivations bipolaires jumelées au niveau des aires frontales, pariétales et occipitales droites et gauches. L'excitabilité réticulaire a été déterminée par la mesure de la durée des réactions d'activation corticale provoquées par stimulation électrique du nerf sciatique (courant carré - 30/sec - 2 m.sec - 6 à 8 v.). L'excitabilité corticale a été déterminée par la mesure de la durée, de la vitesse de généralisation et de la fréquence des post-décharges épileptiques provoquées par stimulation électrique corticale localisée au niveau d'un hémisphère (électrodes de stimulation distantes de 5 mm - courant carré 30/sec-2 m.sec. 8 à 12 v.).

Nous avons étudié les effets exercés par des doses faibles et fortes et chez un animal, suivi en même temps les variations de l'ionogramme (dosage des chlorures, de Na^+ et du K^+). dans le sang prélevé par ponction veineuse). Les variations de la pression artérielle carotidienne ont été enregistrées au moyen d'un manomètre de Ludwig.

1) Action exercée sur l'électrogénèse corticale

a) action de doses faibles. Expérience 1.

L'injection intraveineuse de 10 mg/kg chez un animal dont le tracé normal était désynchronisé n'entraîne pas de modifications du tracé, ni de la pression artérielle. Dix et vingt minutes après, le tracé est toujours désynchronisé mais trente minutes après on voit apparaître des épisodes lents dont la fréquence et la longueur augmentent au bout de quarante minutes.

La réinjection de 20 mg/kg ne modifie pas la pression artérielle et entraîne une désynchronisation temporaire contemporaine de l'injection, puis le tracé reprend son aspect antérieur.

Dix minutes après on observe une tendance à la synchronisation mais ce phénomène est passager car il diminue au bout de 20 mn. et la désynchronisation augmente au bout de 30 et 45 mn.

b) action de doses fortes. Expérience 2

Cet animal présentait au normal un tracé mixte désynchronisé avec de rares phases synchronisées d'une durée de 13 sec.

L'injection de 100 mg/Kg de glycyrrhizate de Na entraîne une désynchronisation au moment de l'injection, puis une phase synchronisée nette avec bouffées en fuseaux durant 1 minute. A la suite d'une stimulation du nerf sciatique ayant provoqué un arousal le tracé ne se resynchronise pas et présente une alternance de phases synchronisées et désynchronisées. Ces dernières plus longues. Dix minutes après il en est de même, les phases désynchronisées durent 24 sec., les synchronisées 13 sec. L'injection de 200 mg/Kg ne provoque pas de modification immédiate importante sauf une légère augmentation du voltage des bouffées en fuseaux.

Quinze minutes après le tracé présente une tendance à la désynchronisation avec quelques phases plus lentes de courte durée constituées surtout par des bouffées en fuseaux.

Vingt minutes après le tracé est du même type.

Quarante minutes après le tracé est désynchronisé avec des bouffées de fuseaux nets. A la suite d'une stimulation du nerf sciatique le tracé se synchronise nettement : les bouffées en fuseaux deviennent plus nombreuses, des ondes lentes apparaissent puis le tracé prend l'aspect observé pendant le sommeil.

Une heure après le tracé est un peu moins synchronisé, mais présente encore de nombreuses bouffées en fuseaux. Réapparition de phases spontanément désynchronisées.

Expérience 3

Chez cet animal l'ionogramme a pu être déterminé au cours de l'expérience.

Le tracé normal était entièrement désynchronisé avant l'injection de produit.

L'injection intraveineuse de 200 mg/Kg de glycyrrhizate de Na entraîne une diminution du voltage contemporaine d'une hypotension transitoire mais n'engendre pas de synchronisation du tracé :

Trente minutes après le tracé est toujours désynchronisé et de bas voltage alors que l'ionogramme montre une hyponatrémie et une hyperkaliémie.

Une heure après le tracé présente le même aspect alors que les taux sanguins de Na et K retournent à leurs valeurs initiales.

Il en est de même 1 heure trente après, alors que la fuite potassique s'amorce et qu'on observe une hypokaliémie nette.

Deux heures après l'hypernatrémie commence à se manifester, la kaliémie restant stationnaire.

Trois heures après le rapport Na/K n'ayant pas varié par rapport à la précédente mesure, le tracé est toujours désynchronisé avec une légère tendance au ralentissement.

Quatre heures après l'hypernatrémie est à son maximum la kaliémie recommence à augmenter, le tracé est toujours désynchronisé et de bas voltage.

II - ACTION EXERCEE SUR L'EXCITABILITE RETICULAIRE

Les résultats obtenus sont portés dans le tableau suivant.

Tableau XXVII

Action exercée sur l'excitabilité réticulaire

Dose mg/Kg	Temps après inj.	Durée de l'arousal (sec.)	Observations
Expérience 1			
0		25	Diminution seulement de l'arousal
10	2	55	"
	10	22	"
	30	24	"
	40	29	"
20	2	22	"
	10	20	"
	20	19	"
	30	21	"
	45	15	"
Expérience 2			
0		54	
100	2	30	Le tracé ne se resynchronise pas comme avant la stimulation
	10	24	
200	2	49	
	40	11	à la suite de cette stimulation la synchronisation augmente
		8	seuil 7 v
		7	seuil 7 v
		11	seuil 8 v
	60	16	seuil 8 v

Au cours de la troisième expérience il ne nous a pas été possible d'étudier l'influence du produit sur l'excitabilité réticulaire. En effet, le tracé n'ayant présenté aucune tendance à la synchronisation il ne nous a pas été possible de déterminer la fin des réactions d'activation pendant la plupart des déterminations. Notons cependant une diminution de l'arousal au bout de 34 sec. aux essais effectués 2 et 3 h. après l'injection de 200 mg/Kg de glycyrrhizate de Na, c'est-à-dire au moment où l'hypernatrémie et l'hypokaliémie sont nettes.

III - ACTION EXERCEE SUR L'EXCITABILITE CORTICALE

Les résultats obtenus sont portés dans le tableau suivant :

Tableau XXVIII

Action du glycyrrhizate de Na sur l'excitabilité corticale.

Dose mg/Kg	Temps après inj. (min.)	Volt	Caractères de la post - décharge				
			latence (sec.)	durée de général. (sec.)	Fréq. déch.	durée totale (sec.)	Localisation
Expérience 2							
0		10	0	-	L	32	PHS
		11	0	0	RR	20	G
100	5	10	0	16	L	41	PHS
		11	0	-	L	54	PHS
200	2	10	0	-	L	49	PHS
	15	11	0	8	L	63	G
	20	10	0	-	L	44	PHS
		11	0	9	L	63	G
	45	10	0	-	L	29	PHS
		11	0	-	R	69	PHS
	60	10	0	-	R	143	PHS
		11	0	9	R	90	G

Tableau XXIV

Action du glycyrrhizate de Na sur l'excitabilité corticale

Dose mg/Kg	Temps après inj. (Min)	Volt	Caractères de la post-décharge					Ionogramme	
			latence (Sec.)	durée général (sec.)	Fréq. déch.	Durée totale (sec.)	Localisation	Na^+ meq/l	K^+ meq/l
Expérience 3									
0		10	17	15	L	144	PHS	132	3,13
		12	0	0	RR	28	G		
200	5	10	pointes localisées pendant 23s pas de crise						
	10	12	5	-	LL	25	F		
	30	12	7	-	LL	122	F	112	4,74
	60	12	0	0	RR	217	Gpuis F	131	2,87
	90	10	0	53	LL	340	PHS	130	2,62
	105	12	0	0	R-	383	G		
	120	10	38	120	L	880	G	142	2,70
	150	12	5	0	L	466	PHS		
	180	12	7	17	L	610	PHS puis F	132	2,70
	240	12	8	28	LL	788	PHS	147	3,26

RR - rythme très rapide. R = rythme rapide. LL - rythme très lent.
L - rythme lent - PHS - crise prédomine à l'hémisphère stimulé.
G - crise généralisée. F - crise focalisée.

Discussion

Les faibles doses de glycyrrhizate de Na, 10 et 20 mg/Kg injectées par voie intraveineuse modifient peu l'électrogénèse corticale sauf une légère tendance passagère à la synchronisation observée avec la plus faible dose.

Les fortes doses, 100 et 200 mg/Kg exercent des effets irréguliers selon les animaux puisque nous avons observé un tracé de type sommeil aux ondes lentes, bouffées en fuseaux, quarante minutes après l'injection d'une dose totale de 300 mg/Kg dans l'expérience 2, alors que dans l'expérience 3,200 mg/Kg n'ont provoqué aucune tendance à la synchronisation.

La diminution de l'excitabilité réticulaire est faible dans l'expérience 1 bien que la durée d'arousal soit diminuée 45 minutes après injection d'une dose totale de 30 mg/Kg. Elle est très nette dans l'expérience 2 dès la dose de 100 mg/Kg et surtout 40 min. après l'injection de 200 mg/Kg au moment où le tracé prend un aspect de sommeil, mais elle n'a pu être mise en évidence dans l'expérience 3.

L'excitabilité corticale paraît diminuée dans l'expérience 2 après l'injection de 100 mg/Kg. En effet la fréquence des décharges se ralentit, la durée nécessaire à la généralisation augmente alors que primitivement pour certains voltages de stimulation les crises étaient généralisées d'emblée et les post-décharges prédominent à l'hémisphère stimulé. Ces effets durent 1 heure.

Dans l'expérience 3, où l'ionogramme a pu être établi, nous avons enregistré quelques résultats paradoxaux. En effet, dans la première demi-heure qui suit l'injection, alors que nous observons une hyponatrémie et une hyperkaliémie, l'excitabilité corticale est nettement diminuée avec apparition d'un temps de latence, ralentissement extrême de la fréquence des décharges et focalisation de celles-ci, alors qu'elles étaient primitivement généralisées.

Ce n'est que 3 et 4 h. après l'injection que l'excitabilité corticale diminue à la suite de l'hypernatrémie constatée au même moment et en accord avec les conclusions des travaux de VOODBURY (78).

L'examen du caractère des crises provoquées alors traduit mieux que les valeurs de la latence, de la durée de généralisation qui augmente, que le ralentissement de la fréquence et que la prolongation de la durée des décharges (qui sont d'autant plus longues qu'elles sont plus lentes) cette diminution de l'excitabilité.

En effet, au bout de 3 heures l'excitation au voltage le plus élevé engendre une crise qui commence par quelques pointes isolées au lieu d'être formée par une décharge continue rapide comme au normal. La crise lente ne débute qu'après 7 secondes, elle se généralise mais prédomine à l'hémisphère stimulé et même redevient focale au bout de 470 sec.

Quatre heures après, le départ est encore plus progressif, les pointes elles-mêmes étant supprimées. Le rythme d'abord très lent ne s'accélère qu'au bout de 348 sec.

Le glycyrrhizate de sodium paraît donc dans l'ensemble, diminuer l'excitabilité corticale. Cette diminution est la conséquence de l'hypernatrémie chronique que cette substance entraîne.

EXAMEN D'ENSEMBLE DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

Dans la première partie de ce travail, nous présentons une mise au point des nombreuses recherches dont a été l'objet la réglisse. Cette brève revue nous permet de constater que, si l'acide glycyrrhizique, constituant caractéristique de la plante, a été déjà étudié par de nombreux auteurs, certaines données chimiques et physiologiques restent cependant peu précises et parfois même contradictoires.

L'objet de nos recherches consiste à apporter quelques précisions dans ces domaines. Les résultats acquis sont de deux ordres :

- chimique et physicochimique
- pharmacologique.

A - Résultats d'ordre chimique et physicochimique

1) Résultats analytiques

Nous avons utilisé les principales techniques préconisées dans le but d'effectuer le dosage de l'acide glycyrrhizique dans la plante et dans les extraits de réglisse. La comparaison des résultats obtenus nous permet de juger de la valeur des différentes méthodes. C'est ainsi qu'il ressort que le procédé gravimétrique du Codex conduit à des valeurs inconstantes. La méthode de HOUSEMAN, basée sur la pesée de l'acide glycyrrhizique précipité et préalablement purifié, n'est pas rigoureusement spécifique ; elle est par contre fidèle et d'une application aisée. Enfin les méthodes colorimétriques de FUCHS d'une part, et de WIEST d'autre part, qui permettent de doser respectivement la partie osidique et l'aglucone, donnent des résultats satisfaisants. Elles sont cependant délicates à mettre en oeuvre.

2) Préparation de l'acide glycyrrhizique

L'examen critique des méthodes proposées pour l'extraction de l'acide glycyrrhizique nous conduit à la conclusion qu'aucune d'elles ne permet d'obtenir la substance à l'état pur. Nous avons mis au point un procédé qui conduit à l'obtention de l'acide glycyrrhizique et de ses sels alcalins dans un état de haute pureté, comme le montrent les critères chimiques et physiques auxquels nous avons fait appel.

3) Constitution de l'acide glycyrrhizique

Ayant en notre possession une substance pure, nous avons essayé de contribuer à la connaissance de sa constitution.

- Aglucone : l'hydrolyse chimique de l'acide glycyrrhizique, suivie de cristallisations successives, a permis d'obtenir l'acide glycyrrhétinique pur. Ce dernier a été dédoublé en ses deux isomères α et β selon le procédé de BEATON et SPRING. L'examen physicochimique de ces deux corps a été effectué : ils se différencient par leur pouvoir rotatoire, le point de fusion, et par spectrophotométries ultraviolette et infrarouge.

C'est ainsi que l'on note pour l'isomère α un pouvoir rotatoire spécifique de $[\alpha]D = + 102°$, alors que celui-ci est de $[\alpha]D = + 160°$ pour l'isomère β. Le point de fusion de l'acide β-glycyrrhétinique est de 325°C., celui de l'acide α-glycyrrhétinique est égal à 300°C.

En solution éthanolique les deux isomères présentent un maximum d'absorption en lumière ultra-violette pour une longueur d'onde de 249 mμ. Cependant l'étude des spectres ultraviolets de ces substances, en solution méthanol-chloroforme, montre pour l'acide α un déplacement du maximum d'absorption vers les courtes longueurs d'onde (λ m = 240 mμ) alors que ce phénomène n'est pas observé pour l'acide β-glycyrrhétinique.

De l'examen des spectres infrarouges, il ressort que les bandes caractéristiques du groupement hydroxyle libre présentes dans l'isomère β, disparaissent totalement dans les tracés relatifs à l'isomère α et sont remplacées, alors, par les bandes caractéristiques de la liaison lactone.

Cette dernière observation associée aux différences existant dans les valeurs des pouvoirs rotatoires spécifiques et des points de fusion, d'une part et d'autre part, dans le déplacement du maximum d'absorption en lumière ultraviolette, permettent de penser que l'acide α-glycyrrhétinique possède une énergie interne supérieure à celle de son isomère β.

- Partie osidique : L'hydrolyse chimique s'est avérée insuffisante pour nous permettre l'étude convenable de la fraction osidique. Nous avons adopté l'hydrolyse par voie enzymatique. Ce procédé nous a été inspiré par les données de JAYLE et ses collaborateurs concernant le dosage des 17-cétostéroïdes urinaires. L'hydrolysat obtenu par action de la β-glucuronidase est purifié, puis étudié par chromatographie sur papier. Ceci nous a permis de préciser que la partie osidique de l'acide glycyrrhizique est constituée par un acide di-glucuronique.

B - Résultats d'ordre pharmacologique

C'est bien parce que nous possédions des substances à l'état pur que nous avons pu procéder valablement à une étude pharmacologique générale et rechercher en particulier si l'acide glycyrrhizique n'avait pas sur le métabolisme de l'eau et des électrolytes une action analogue à celle attribuée à l'acide glycyrrhétinique par différents auteurs.

1) Pharmacologie générale

Administrant l'acide glycyrrhizique sous forme de solution aqueuse de son sel de sodium, par voie parentérale, nous avons noté sa très faible action sur le rythme cardiaque, la fréquence et l'amplitude du mouvement respiratoire. Par contre, un effet hypotenseur léger mais net et durable a été observé.

En outre, sa toxicité est faible (D L.50 = 1 475 mg/kg IP.) et son action hémolytique rencontrée très souvent chez les saponines est négligeable.

2) Action minéralocorticoïde

L'administration de l'acide glycyrrhizique (sous forme de sels alcalins en solution aqueuse) par voie intra-péritonéale, chez le Rat, le Lapin et le Chien provoque un remaniement sensible des électrolytes urinaires et sanguins. Celui-ci se traduit :

- dans les urines, par une diminution du taux des ions chlorure et sodium s'accompagnant d'une augmentation du taux de l'ion potassium.

- dans le sang, par une augmentation du taux des ions chlorure et sodium parallèle à une diminution du taux de l'ion potassium.

Cette action est rapide et se manifeste 30 minutes après l'administration parentérale. Elle est réversible. En effet, nous avons observé le rétablissement du taux normal des électrolytes dans le sang et dans l'urine deux heures après la fin du traitement par une dose unique. Ce rétablissement nécessite un délai de 48 heures après l'administration de doses répétées.

Il est remarquable de noter que l'utilisation du glycyrrhizate de potassium n'est pas suivie d'une hypokaliémie.

3) Action sur le système nerveux central

L'examen des tracés de l'électroencéphalogramme obtenus sur le Lapin traité par le glycyrrhizate de sodium en solution aqueuse injecté par voie intraveineuse, révèle certaines modifications sur l'électrogénèse corticale et les excitabilités corticales et réticulaires. Ces modifications paraissent liées aux variations ioniques engendrées par cette substance.

C - Résumé des conclusions

En bref, nous avons réussi, au cours de notre travail, à isoler l'acide glycyrrhizique hautement purifié, ainsi que ses sels alcalins.

A partir de ces substances, nous avons pu :

- au point de vue chimique et physicochimique, d'une part, obtenir l'acide glycyrrhétinique pur et en faire l'étude des isomères, d'autre part, préciser que la fraction osidique est l'acide diglucuronique.

- au point de vue pharmacologique, démontrer leur action du type minéralocorticoïde et noter enfin leur faible toxicité et leur action hémolytique insignifiante.

BIBLIOGRAPHIE

1 - BEATON (J.M.) et SPRING (F.S.) - The isolation and caracterisation of glabric acid a new triterpenoïd acid from licorice root., J. Chem. Soc. 1956, *2* , 2417 - 2419.

2 - BERGMANN (F.) - Uber das enzumatische verhalten von glucuronide und über glycyrrhizinsaure., Biochem. 1933, *267*, 296 - 308.

3 - BERGMANN (E.), BERGMANN (F.) - Zur kenntnis der glycyrrhetinsaüre., Helv. Chim. Act. 1937, *20*, 207 - 208.

4 - BERGMANN (D.), PINCHAS (S.) - Rev. trav. Chim., 1952, *71*; 161.

5 - BERTOLO (P.) - Sopra alcune reazioni della glicirrizina. Giorn. Chim. Ind. 1925, *7*, 404 - 405.

6 - BERZELIUS (J.J.) - Uber den Sussholzzucker., Ann. Phys. Chim. Leipzig 1827, *10*, 243 - 247.

7 - BIJLSMA. Nadere medeceling over succus liquiritea., Ned. tijdshr. Geneesk. 1948, *92*, 3569 - 3570.

8 - BILHAM (P.), KON (G.) and ROSS (W.C.J.) - Sapogenins XIV. The constitution of glycyrrhetinic acid ant its relation to oleanolic acid., J. Chim. Soc. 1942, 535 - 539.

9 - BORST (J.G.G.) HOLT (S.P.) TEN VRIES (L.A.) de, MOLUYSEN (J.A.) Synergistic action of licorice and cortisone in Addison's and Simmon's disease., J. Pharm. Pharmacol. 1953, *5*, 652.

10 - CEDEBERG (H.) - Kwantitativ bestämning av glycyrrizincyra i lakrits—beredninger., Svensk Farm. Tidskr. 1927, *31*, 121 - 126.

11 - COSTELLO (C.H.), LYNN (E.V.) - Estrogenic substances from plants glycyrrhiza., J. Amer. Pharm. Assoc. 1950, *39* , 177 - 180.

12 - CZOK (G.), KREIENBERG (W.) - Die beeinflusung der salzsäurebildung Im. magen durch. targesin und lakritze., Deut. med. wochshr. 1954, *79*, 831 - 832.

13 - DJERASSI (C.), FOLTZ (C.M.) - Terpenoids experiments in the glycyrrhetinic acid series., J. Amer. Chim. Soc. 1954, *76* , 4085 - 4088.

14 - FISCHER (L.), LYNN (E.V.) - Licorice fern and wild licorice as substitues for licorice., J. Am. Pharm. Ass. 1933, *22* , 1225 - 1230.

15 - FUCHS (L.), TRAUNER ADELPOLLER - Eine kolorimetrisch methode zur bestimmung des glycyrrhizaüregehaltes der radi liquiritise., Scienta Pharm. 1947, *1*, 2 - 17.

16 - FINNEY (R.S.H.), SOMERS (G.E.) et WILKINSON (J.H.) - J. Phar Pharmacol., 1958, *10*, 687 - 695.

17 - GALASSI (M.) - Sulla natura chimica della glycyrrhizina - Arch. Farmacol. Sper. 1911, *43*, 418 - 420.

18 - GORUP - BESANEZ (E.) - Zur Kenntniss des glycyrrhizins Ann. der Chem und Pharm. 1861, *118*, 236 - 247.

19 - GALAL (E.E.) - The effects of glycyrrhetinic acid on salt and walter metabolism., Brit. Journ. Pharmacol. 1955, *10* , 305 - 313.

20 - GIAMMONA (A.) - Sulla natura degli zuccheri gontenuti nella ratice di liquirizea (glycyrrhiza glabra)., Ann. Chim. Appl. 1929, *19*, 110 - 127.

21 - GRIESZMAYER (V.) - Das glycyrrhisin. Oder der lakritzensalf Dinglers Polytech. J. 1873,*209*, 228 - 230.

22 - GROEN (J.), PELSER (H.) WILLEBRANDS (A.F.), KAMINGA (C.E.) J. Pharm. Pharmacol. 1951,*3*, 862.

23 - HABERMANN (J.) - Ann. Chem. Justus. Liebig 1879,*197*, 105 - 125.

24 - HAWORTH (R.D.) - The triterpenes., Ann. Repts. on Progr. Ch Societ. London 1937,*34*, 327 - 342.

25 - HASSAN (W.E.) PALUMBO (J.F.) ELMADJEAN (F.) - The electrolytic effects of licorice preparation in the adrenalectomized rat., J. Amer. Pharm. Ass., 1954,*43*, 551 - 554.

26 - HOUSEMAN (P.A.) - Analysis of licorice root and licorice extract., J. Assoc. Off. Agric. Chem. 1922, *6*, 191 - 196.

27 - HOUSEMAN (P.A.) et SWIFT (C.K.) - Studies on licorice root and licorice extract., A new substance in chinese licorice root., Am. J. Pharm. 1929,*101*, 679 - 689.

28 - HAMILTON (J.K.) PARTLOW (E.V.), THOMSON (N.S.) Tappi 1958, *41*, 804.

29 - JAYLE - Clinica Chimica Acta 1959,*4*, 276.

30 - KARRER (P.) KARRER (W.) CHAO (J.C.) - Beitrag zur kenntniss des glycyrrhizins., Helv. Chim. Acta 1921,*4*, 100 - 112.

31 - KARYONE (T.), NONAKA (O.) - Sweet constituents of licorice root Pharm. Soc. Japan 1937,*57*, 20 - 24.

32 - KANOUI (F.), GUYET (P.), MARTEAU (J.) - Essai d'amélioration de la tolérance digestive de la phénylbutazone par le suc de réglisse déglycyrrhiziné. Les Echos de la Médecine, Janv. 1960.

33 - KISATATO (Z.) - Uber de konstitution der sauren sapogenine XV Acta Phytochim. Japan, 1939, *11*, 1 - 25.

34 - KOBERT (R.) - Uber zwei süszschmeckende drogen., Ber. Deut. Pharm. Ges 1915,*25*, 162 - 185.

35 - LEUENBERGER (H.) - Zur kenntnis der glycyrrhetinsaüre dissertation., Eidg. Techn. Hochsch 1938 Zurich.

36 - LINZ (A.) - Comparative investigation of suggested methods for the determination of glycyrrhizin in licorice and succus liquiritise., Arch. Pharm. 1916,*254*, 65 - 134.

37 - LIPTSHITZ (W.), HADIDIAN (Z.) KERPCSAR (A.) - J. Pharm. Exp. Therap. 1942, *75*, 316.

38 - LYTHGOE (R.), TRIPETT (S.) - Constitution of the disaccharide of glycyrrhinic acid. J. Chem. Soc. 1950, 1983 - 1990.

39 - MACHADO (A.) - Chemical study of brasilian licorice., Rev. Soc. Brazil. Quim. 1941, *10*, 101 - 103.

40 - MITCHELL (W.) - Cortisone-like products from licorice Nat. Research. Develop. Corp. Brit. 1955, *724*, 230.

41 - MITCHELL (W.) Licorice and glycyrrhetinic acid. Manuf. Chemist 1956, *27*, 169 - 172.

42 - NIEMAN (C.) - De structuur van glycyrrhizinruur chem Weekblad 1942, *48*, 213.

Zoethout drop, glycyrrhizine in glycyrrhetinezum. Consuded, 1952, *9*, 372 - 373, 407 - 408.

43 - NELEMANS-STAMPERIUS (J.A.E.) - Succus liquiritise em maagzweren (em pharmacologisch)., These doct. Med. Utrech 1949.

44 - NITSCHKOFF (S.) - Betrachtungen zur gastritis und ulcultherapic mit succan in klinic und praxis., Med. Monatsschr., 1954, *8*, 256 - 259.

45 - PEYER (W.) - Die untersuchung und werthestimmung von succus liquiritise. A post Zig. 1925, *40*, 501 - 504.

46 - PURI (R.) et SESHADRI (T.R.) - Coloring matter in licorice root Soc. of Sc. and Ind. Rest. 1954, 13 A.

47 - Mme POINTET-GUILLOT - Thèse doct. Univ. Paris, 1958.

48 - REVERS (F.E.) - Heeft succus liquiritiseen genezende werking op de maagzwer-ned. Tijdschr. Geneesk 1946, *90*, 135 - 137.

49 - REVERS (F.E.) - De behandeling van ulcus ventriculi en ulcus duodeni met succus liquiritiae ned tijdschr Geneesk 1948, 92 (2), 2968 - 2973 92 (4), 3568 - 3569.

50 - ROUDIER (A.) et EBERHARD (L.) - Bull. de la Soc. Chim. 1960, *11*, 2074 - 2085.

51 - ROUSSIN (Z.) - Sur la nature de la matière sucrée de la racine. Combinaison ammoniacale de la glycyrrhizine. J. Pharm. Chim., 1875, *22* 6 - 15.

52 - RINGEL (J.) - Zur kenntnis des zurckerteils des glycyrrhizins Dissertations Technique Hochschule. Breslau 1939.

53 - RUZICKA (L.) et LEUENBERGER (H.) - Zur kenntniss der glycyrrhetinsaure., Helv. Chim. Acta, 1936, *19*, 1402 - 1406.

54 - RUZICKA (L.) et COHEN (S.L.) - Polyterpene und terpincide CXIV oxydationen in der reihne der oleanolsaüre chne sprengung des ringsystems. Uber die nature des vierten sauerstoffatoms der glycyrrhetinsaüre., 1937, A Helv. Chim. Acta, *20*, 804 - 808.

55 - RUZICKA (L.) et MARXER (A.) - Zur kenntnis der triterpene XLIV. Umwandlung der glycyrrhetinsaüre in β-amyrin Helv. Chim. Acta, *22*, 195 - 201.

56 - RUZICKA (L.), JEGER (O.) et WINTER (M.) - Zur kenntnis der triterpene LXXV - zur lage der carboxylgruppe bei der olsanolsaüre und der glycyrrhetinsaure., 1943 Helv. Chim. Acta, *26*, 265 - 279.

57 - SCHALES (O.) et SCHALES (S.S.) - A simple and accurate method for the determination of chlorides in biological fluids., J.B.C. 1954, *140*, 879.

58 - SCHULZE (E.) - Die wirkung einer reinsubstanz aus succus liquiritise bei der behandlung des magengeschwürs 1953 B - Munich. Med Wochscar., *95*, 47.

59 - SCHULZE (E.), FRANKE (R.) and KELLER (N.) - Uber die wirkungen von succus liquiritiae, 1954 Deut. Med. Wochschr., *79*, 716 - 719.

60 - SCHRUFFER (H.) - Zur ambalenten von gastritis und ulkus 1954 Therap. Gegenwart, *93*, 468 - 469.

61 - SESTINI (F.) - sul glucisude della liquirizia. Gazz. Chim. Ital., 1878, *8*, 454 - 462.

62 - SHINODA (J.) and UEEDA (S.) - Uber das flavanon-glucosid in glycyrrhiza glabra. L; Var Glandulifera. Regel et Erder, 1934. Ber. Deut. Chem. Ges., *67 B*, 434 - 440.

63 - STAUDNER (F.) - Therapeutische erfahrungen mit succus liquiritiae., 1952. Wien. Klin. Wochschr., *64*, 424.

64 - TOCCO TOCCO (L.) - E il principio della liquirizia una substanza del gruppo delle saponine ?, 1924 B - Arch. Inter. Pharmcodynamie, *28*, 455 - 456.

65 - TSCHIRCH (A.) - Handbuch der pharmakognoshe Tauchnitz Vealag Liepzig.

66 - TSCHIRCH (A.) et CEDERBERG (H.) - Uber das glycyrrhizin 1907. Arch. Pharm. 245, 97 - 111.

67 - TSCHIRCH (A.) et GAUCHMANN (S.) - Weitere unter suchungen über die glycyrrhizinsaüre. 1908 A. Arch. Pharm. 246, 545 - 558.

68 - VELLUZ (L.) - Action du glycyrrhizate de potassium sur la toxine tétanique., 1932. C.R. Soc. Biol., *111*, 354 - 355.

69 - VERUEYEN (H.C.A.) - De invloed van succus liquiritase op de maagsuursecretie em zijn werking bij ulcus ventriculi., 1948. Ned. Tijdschr. Geneesk, *92*, 2910.

70 - VITARELLE (R.) - Le dosage de la glycyrrhizine dans les préparations de la réglisse., Thèse Doct. Pharm. 1938.

71 - VINCENT (D.) - Etude pharmacologique de la réglisse (glycyrrhiza-glabra)- réglisse et acétylcholine., Thérapie 1951, *6* , 448.

72 - VOSS (W.) - Zur kenntnis des glycyrrhizins 1936. Angew. Chem. *49* , 556 - 557.

73 - VOSS (W.) et BUTTER (G.) - Uber die isomérie der glycyrrhetinsaüre 1937. Ber. Deut. Chem. Ges. *70 B*, 122 - 123.

74 - VOSS (W.) et PFIRSCHKE (J.) - Uber ein neuartiges disacharid als zuckeranteil des glycyrrhizins., Ber. Deut. Chem. Ges., *70 B*, 132-137

75 - VOSS (W.) KLEIN (P.) et SAUER (H.) - Zur Kenntnis des glycyrrhizins 1937. Ber. Deut. Chem. Ges. *70 B* 122 - 132.

76 - VOSS (W.) WASCH et HEISIG. - Angew. Chem. 1936, *49* , 556.

77 - WIEST (F.) - Kolorimetriche Bestimmumg der glycyrrhinsaüre als aglukon. Th. Doct. Univ. Pharm. Zurich 1949.

78 - WOODBURRY (J.D.M.) - J. Pharmacol. exp. thérap., 1952, *105*, 27.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 1

DONNEES GENERALES SUR LA REGLISSE

A - Rappels botaniques 5
B - Préparations à partir de la réglisse 7
C - Constituants de la réglisse 11
D - Propriétés pharmacologiques 23
E - Autres plantes contenant de la glycyrrhizine 25

TRAVAUX PERSONNELS

Première Partie

ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ACIDE GLYCYRRHIZIQUE ET DE SES PRODUITS D'HYDROLYSE.

CHAPITRE I - EVALUATION DE LA TENEUR EN ACIDE GLYCYRRHIZIQUE

I - Généralités 29
II - Dosage par gravimétrie 30
III - Dosage par colorimétrie 32
IV - Conclusion du chapitre 35

CHAPITRE II - EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ACIDE GLYCYRRHIZIQUE

I - Principe 37
II - Glycyrrhizine ammoniacale 37
A - préparations courantes 37
B - méthode proposée 40
III - Acide glycyrrhizique 45
IV - Conclusion du chapitre 48

CHAPITRE III - SUR LA CONSTITUTION CHIMIQUE DE L'ACIDE GLYCYRRHIZIQUE

I - Généralités 49

Pages

II - Hydrolyse 49
III - Partie osidique 50
IV - Aglucone : acide glycyrrhétinique 59

Deuxième Partie

ETUDE DES PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DES SELS ALCALINS DE L'ACIDE GLYCYRRHIZIQUE.

But des recherches 69

CHAPITRE I - TOXICITE ET ACTION HEMOLYTIQUE 71

CHAPITRE II - ACTION SUR LE TAUX DES ELECTROLYTES URINAIRES ET SANGUINS CHEZ LES ANIMAUX D'EXPERIENCE

I - Méthodes Générales d'expérimentation 75
II - Expériences sur le Rat blanc 76
III - Expériences sur le Lapin 80
IV - Expériences sur le Chien 86

CHAPITRE III - ACTION DU GLYCYRRHIZATE DE SODIUM SUR LE SYSTEME CARDIO-VASCULAIRE ET LE RYTHME ET LA FREQUENCE RESPIRATOIRES 91

CHAPITRE IV - ETUDE DES EFFETS EXERCES PAR LE GLYCYRRHIZATE DE SODIUM SUR L'ELECTROGENESE CORTICALE ET LES EXITATIONS CORTICALES ET RETICULAIRES 97

EXAMEN D'ENSEMBLE DES RESULTATS ET CONCLUSIONS 103

BIBLIOGRAPHIE 107

TABLE DES MATIERES 111

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

SUR L'ACTIVITE COENZYMATIQUE DES NUCLEOTIDES RECEMMENT DECOUVERTS.

Lu et approuvé
Le Président du Jury
C. DUMAZERT

Vu et approuvé
P. le Doyen L'assesseur
J. DELPHAUT

Vu et permis d'imprimer
Aix, le 20 juin 1961
Le Recteur
J. BLACHE.

IMP. LOUIS-JEAN – GAP
Dépôt légal n° 229 – 1961